

IN-VITRO UND IN-VIVO

Untersuchungen an frischen
und friergelagerten
Thrombozytenkonzentraten

Helmut Kettler

Diss.
München
1985

IN - VITRO UND IN - VIVO UNTERSUCHUNGEN AN FRISCHEN UND
FRIERGELAGERTEN THROMBOZYTENKONZENTRATEN

Helmut Kettler



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der III. Medizinischen Klinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Wilmanns

Abteilung für Transfusionsmedizin

Leiter: Prof. Dr. W. Mempel

IN - VITRO UND IN - VIVO UNTERSUCHUNGEN AN FRISCHEN UND
FRIERGELAGERTEN THROMBOZYTENKONZENTRATEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Helmut Kettler

aus
Gundelfingen

1984

Mit Genehmigung des Fachbereichs der
Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.W.Mempel

Mitberichterstatter: Prof.Dr.W.Wilmanns

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 1985

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.med.
W.Mempel für die Überlassung des Themas und die
Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Sehr herzlich danke ich Herrn Dr.med.M.Heim für
die zahlreichen, wertvollen Anregungen und allen
Mitarbeitern des Transfusionszentrums im Klinikum
Großhadern für die Hilfe bei der Durchführung der
Untersuchungen.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof.Dr.med.
E.Hiller für die Erlaubnis zur Mitbenutzung der
Laborgeräte.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	Einführung	1
2.	Problemstellung und Zielsetzung	10
3.	Patientengut, Material und Methoden	11
3.1.	Transfusionsmodus	11
3.1.1.	Auswahl der Patienten	11
3.1.2.	Transfusionskollektive	11
3.1.3.	Blutabnahmen für Thrombozytentests	13
3.2.	Herstellung der Thrombozytenkonzentrate	13
3.2.1.	Technik der Zellseparation	13
3.2.2.	Spenderauswahl und Verträglichkeit der Zellseparation	13
3.2.3.	Antikoagulation der Thrombozytenkonzentrate	14
3.2.4.	Entnahme des Thrombozytensammelbeutels aus dem Zellseparator	14
3.3.	Einfriermethodik	15
3.3.1.	Einengung des Thrombozytenkonzentrat-Volumens	15
3.3.2.	Frierlösungen	15
3.3.3.	Einfrieren, Einfrier- und Lagertemperatur	17
3.4.	Vorbereitung friergelagerter TKs zur Transfusion	18
3.4.1.	Auftauen und Waschen der TKs	18
3.4.2.	Abnahme der Meßproben, Kennzeichnung der TKs	19
3.5.	Thrombozytentestmethoden	19
3.5.1.	Problematik der Thrombozytentests	19
3.5.2.	Thrombozytenzählung	19
3.5.3.	Thrombelastographie (TEG)	20
3.5.4.	Resonanzthrombographie (RTG)	22
3.5.5.	Gerinnselretraktionsfähigkeit	24

3.5.6.	Thrombozytenaggregationstests	26
3.5.6.1.	Prinzip der Aggregationsmessung	26
3.5.6.2.	Aggregationsinduzierende Substanzen	28
3.5.6.2.1.	ADP-induzierte Aggregation	28
3.5.6.2.2.	Collagen-induzierte Aggregation	30
3.5.6.2.3.	Thrombin-induzierte Aggregation	31
4.	Ergebnisse	34
4.1.	In-vitro Ergebnisse verschiedener Frierlösungen	34
4.1.1.	Frierlösungen 1, 2 und 3	34
4.1.2.	Frierlösungen 4 und 5	36
4.1.3.	Frierlösungen 6 und 7	37
4.1.4.	Frierlösungen 8 und 9	38
4.1.5.	Synopsis der Meßergebnisse der 9 verschiedenen Frierlösungen	39
4.2.	In-vitro Testergebnisse der transfundierten TKs	41
4.3.	In-vivo Testergebnisse der transfundierten Patienten	42
4.3.1.	Kollektiv I, Transfusion frischer TKs	42
4.3.2.	Kollektiv II, Transfusion friergelagerter TKs	45
4.3.3.	Kollektiv III, Transfusion frischer TKs bei den Patienten des Kollektiv II	48
4.3.4.	Synopsis der in-vivo Testergebnisse der Kollektive I, II und III	50
5.	Diskussion	55
5.1.	In-vitro Untersuchungen an friergelagerten TKs unter Verwendung 9 verschiedener Frierlösungen	55
5.2.	In-vitro Untersuchungen an frischen und friergelagerten TKs unter Verwendung von 6% DMSO und Aprotinin	56

5.3.	In-vivo Untersuchungen zur Transfusion frischer und friergelagerter TKs im Vergleich	57
6.	Zusammenfassung	62
7.	Literaturverzeichnis	64
8.	Lebenslauf	70

1.Einführung

Bluttransfusionen zählen in der modernen Medizin zu den häufig durchgeführten ärztlichen Maßnahmen, wobei trotz zahlreicher Einwände gegen die unkritische Anwendung von Blutprodukten wegen der möglichen Gefahren einer Alloimmunisierung der Patienten gegen Spenderantigene sowie der Übertragung von Hepatitis und AIDS (acquired immun deficiency syndrom) die Zahl der durchgeführten Transfusionen nach wie vor eine steigende Tendenz aufweist. Eine Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten in Verbindung mit der Reduktion von Nebenwirkungen bei Transfusionen stellt heutzutage die gezielte Verabreichung verschiedener Blutkomponenten z.B. als Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate, Granulozytenkonzentrate, Fresh Frozen Plasma und Konzentrate von Gerinnungsfaktoren dar. Ein solches Vorgehen erfordert spezielle Präparationsverfahren und Lagerungsmethoden, um die unter hohem organisatorischen und finanziellen Aufwand hergestellten Blutprodukte bei Bedarf auch vorrätig zu haben.

Aus den erwähnten Gründen wurden schon früh Anstrengungen unternommen, um neben der Optimierung der Lagerungsbedingungen bei Raumtemperatur bzw. $+4^{\circ}\text{C}$ (25/30/38) auch Verfahren zu entwickeln, nach denen Blutkomponenten bei niedrigeren Temperaturen (-40°C , -80°C , Gasphase von Flüssigstickstoff = -150°C) über einen längeren Zeitraum eingefroren und im Bedarfsfall in kürzester Zeit zur Verfügung gestellt werden können. Während die Einfrierme-

thoden von Erythrozytenkonzentraten inzwischen soweit gereift sind, daß sie Eingang in die routinemäßige klinische Anwendung gefunden haben, befinden sich entsprechende Verfahren für Thrombozytenkonzentrate erst im Übergangsbereich von der experimentellen Phase zu einer sinnvollen breiteren, klinischen Anwendung. Gerade für Thrombozytenkonzentrate aber ist wegen der nur kurzen Haltbarkeit bei Raumtemperatur von maximal 72 Stunden eine effiziente Einfrier- und Lagerungsmethode von eminenter Bedeutung. Die in letzter Zeit mit Hilfe von speziellen Plastikmaterialien mögliche Lagerung von Thrombozytenkonzentraten bis maximal 5 Tage führt zwar zu erhöhter Verfügbarkeit von TKs insbesondere nachts und an Wochenenden; das wichtige Problem der Alloimmunisierung läßt sich jedoch auch dadurch nicht optimal lösen. Der Einsatz gefrorener Thrombozytenkonzentrate erscheint daher vor allem in folgenden Problembereichen erfolgversprechend: Durch die Verwendung HLA-kompatibler TKs, die an Einzelspendern gewonnen auf Vorrat eingefroren werden, könnte gerade bei Patienten, die einer längerfristigen Thrombozytensubstitution bedürfen (Zyklen zytostatischer Chemotherapie, Knochenmarksdepression durch maligne Erkrankungen, im Rahmen der supportiven Therapie bei Leukämien) (3/35/39), eine Alloimmunisierung mit der Konsequenz künftiger Transfusionsunverträglichkeit vermieden werden. Ebenso erscheint die Verwendung autologer, friergelagerter Thrombozyten, die in therapiefreien Intervallen gewonnen werden, sinnvoll und erfolgversprechend.

Bereits 1961 konnten Cohen und Gardner (6/7) zeigen, daß

Hundethrombozyten, die in einer Plasma-Glycerol-Lösung eingefroren und in einer hypertonen Glukoselösung aufgetaut worden waren, nach Transfusion bei Empfängerhunden eine normale Überlebenszeit aufwiesen. Dasselbe Verfahren, von Baldini und Mitarbeitern (1) auf menschliche Thrombozyten übertragen, brachte jedoch keine nennenswerten Erfolge; zudem verhinderte das Fehlen geeigneter in-vitro Methoden zur Prüfung der Thrombozytenfunktion damals einen weiteren Fortschritt in der Frierlagerung menschlicher Thrombozyten.

Bei Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen (10/22/23/26/27/29/31/39/41) mit dem Ziel, geeignete Verfahren für die Präparation, das Einfrieren, die Lagerung und das Auftauen von Thrombozytenkonzentraten zu entwickeln, stellten sich eine Reihe von Problemen mit zentraler Bedeutung für die Gewinnung hämostatisch wirksamer Thrombozyten nach Frierlagerung und deren Beurteilbarkeit heraus:

- I) Art der Thrombozytengewinnung
- II) Auswahl geeigneter Thrombozytenbeutel
- III) Thrombozytenpräparation vor Einfrieren: eingeeingte - nicht eingeeingte Thrombozytenkonzentrate
- IV) Zugabe eines geeigneten Frierschutzmediums
- V) Einfrier- und Lagertemperatur
- VI) Waschverfahren
- VII) In-vitro und in-vivo Testmethoden

ad I) Thrombozytengewinnung

Die früher geübten Verfahren, bei denen aus Vollblutkonserven von Spendern oder Patienten durch Zentrifuga-

tion eine Separation der korpuskulären Blutbestandteile erreicht wird und die im Überstand angereicherten Thrombozyten selektiv entnommen werden können, werden weitgehend ersetzt durch die Verwendung moderner Zellseparatoren wie den Haemonetics Blood Processor 30 (41), den IBM Blood Cell Processor 2997 (31) oder den Fenwal-Zellseparator CS 3000 (32/36). Zellseparatoren bieten den Vorteil einer hohen Thrombozytenausbeute von Einzelspendern bei einer gleichzeitig geringen Verunreinigung mit anderen Zellen.

ad II) Auswahl geeigneter Thrombozytenbeutel

Bei früheren Untersuchungen wurden im wesentlichen zwei verschiedene Typen von Thrombozytenbeuteln verwendet, nämlich entweder PVC-Plastikbeutel oder sogenannte Polyolefinbeutel. Bereits 1973 wiesen jedoch Kim und Baldini (24) darauf hin, daß die Verwendung von PVC-Plastikbeuteln im Vergleich zu Polyolefinbeuteln zu einer stärkeren funktionellen Schädigung gefrorener Thrombozyten führe, da vermutlich lipophile Weichmachersubstanzen vom Typ des DEHP (Di-2-ethylhexylphthalate) aus dem Beutelmateriale in das Friergut gelange. Dagegen fanden Melaragno und Mitarbeiter 1982 (29) bei vergleichenden Untersuchungen mit PVC-Plastikbeuteln und Polyolefinbeuteln keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Integrität tiefgefrorener Thrombozyten; ebenso fanden sie nahezu gleiche DEHP-Spiegel beim Einsatz beider Beuteltypen.

ad III) Einengung der Thrombozytenkonzentrate

Während bei konventionellen Thrombozytensammelmethoden (Zentrifugation von Vollblutkonserven, Pooling des plätt-

chenreichen Plasmas mehrerer Konserven) eine Volumeneinengung des plättchenreichen Plasmas notwendig ist, um höhere Thrombozytenkonzentrationen zu erreichen, die Kapazitäten in den Tiefkühlschränken zu verbessern und schließlich eine Volumenüberladung transfundierter Patienten zu vermeiden, erscheint bei Thrombozytenkonzentrationen, die mit Zellseparatoren gewonnen wurden, eine zusätzliche Volumeneinengung nicht sinnvoll, da a priori hohe Thrombozytenkonzentrationen gewonnen werden (31/32) und eine Volumeneinengung durch den zusätzlichen Zentrifugationsprozess zu einer weiteren mechanischen Schädigung der Thrombozyten führen würde (11).

ad IV) Frierschutzmedien

Als Gefrierschutzmittel wurden bisher hauptsächlich Glycerin, Hydroxyäthylstärke (HÄS) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie Kombinationen von DMSO und HÄS verwendet (33). Neuere Untersuchungen von Kotelba-Witkowska und Schiffer (29) sowie Melaragno und Mitarbeiter (31) bestätigten die bereits früher von Davian und Pert (8) geäußerte Vermutung, daß DMSO von allen bisher verwendeten Frierschutzmitteln die vergleichsweise besten in-vitro und in-vivo Ergebnisse tiefgefrorener Thrombozyten erlaube, wenn auch in Anbetracht der im Detail recht unterschiedlichen Einfriermethoden eine eindeutige Beurteilung bezüglich des besten Frierschutzes schwierig bleibt. Die erwähnten Autoren empfehlen daher für weitere Untersuchungen zur Gefrierkonservierung von Thrombozyten übereinstimmend die Verwendung von DMSO. DMSO wird zudem neuerdings als Frierschutzmittel für die Konservierung von Knochenmarkszellen

und als Gefrierschutz für menschliche Embryonen im Rahmen der extrakorporalen Befruchtung verwendet (40). Der Proteinaseinhibitor Aprotinin (Trasylol), der bislang in der Gefrierkonservierung nicht angewandt wurde, übt nach Harke und Mitarbeitern (12) auf Thrombozyten einen sogenannten membranstabilisierenden Effekt aus, hemmt die Mikroaggregatbildung in ACD-Blutkonserven und wird daher für alle Techniken empfohlen, bei denen Blut aus dem Organismus entnommen und zentrifugiert wird (Herz-Lungenmaschine, Hämodialyse, Hämoperfusion); zudem komme Aprotinin eine wesentliche Bedeutung bei der Herstellung und Lagerung von Blutkonserven und Blutfraktionen zu. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist auch ein membranprotektiver Effekt des Aprotinins auf Thrombozyten in der Gefrierkonservierung zu erwarten.

ad V) Einfrier- und Lagertemperatur

Thrombozytenkonzentrate werden auch in neuesten Untersuchungen (21/31) entweder bei -80°C oder in der Gasphase von Flüssigstickstoff ($= -150^{\circ}\text{C}$) gelagert. Wichtiger als die Wahl der absoluten Lagertemperatur ist jedoch der Einfrier- und Auftauprozess, wobei allgemein ein schnelles Einfrieren entweder in mechanischen -80°C -Kühlschränken (Frierrate: -1°C bis $-5^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$) oder in automatischen Friergeräten mit kontrollierter Frierrate befürwortet wird. Ebenso wichtig ist das rasche Auftauen der Thrombozytenkonzentrate, das gewöhnlich in einem Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$ bis $+42^{\circ}\text{C}$ für 5 bis 10 Minuten durchgeführt wird.

ad VI) Waschverfahren

In Abhängigkeit vom verwendeten Frierschutzmittel ist vor

der Transfusion gefrorener Thrombozytenkonzentrate ein Waschverfahren notwendig, um die Belastung der transfundierten Patienten mit potentiell toxischen Substanzen möglichst niedrig zu halten. Insbesondere trifft dies auf Konservierungsverfahren zu, bei denen DMSO zur Anwendung kommt (21). DMSO, das sich in den 60er und 70er Jahren einer außerordentlich weiten Verbreitung und Anwendung mit zahlreichen klinischen Indikationen (rheumatischer Formenkreis, Sportverletzungen, Rückenmarksverletzungen, Hirnödeme) erfreute, ist inzwischen in der BRD als Medikament für die intravenöse Anwendung nicht mehr gebräuchlich, da vereinzelte Fälle von Linsentrübungen sowie Veränderungen von Serumenzymen und Hämolyse aufgetreten sind, über die Yellowless und Greenfield 1980 in The Lancet (42) berichteten. Die in diesem Zusammenhang formulierte These zur Toxizität von DMSO wurde jedoch kurze Zeit später von Knott in einem ebenfalls in The Lancet erscheinenden Artikel über die Sicherheit der intravenösen Anwendung von DMSO verworfen (28), so daß bislang - bei Respektierung gewisser Verdachtsmomente - die Anwendung von DMSO in geringen Dosen als unbedenklich erscheint.

ad VII) In-vitro und in-vivo Testmethoden

Die Fülle an bisher beschriebenen und angewandten Thrombozytentestmethoden legt bereits den Verdacht nahe, daß es den Thrombozytentest schlechthin mit optimaler Aussagekraft über die Thrombozytenfunktion nicht gibt. Grundsätzlich zu unterscheiden sind einerseits Testmethoden, für die Probenmaterial aus Thrombozytenpräparationen verwendet wird (reine in-vitro Tests), andererseits Testverfahren, bei denen Venenblut von transfundierten Patienten

einggebracht wird (in-vivo/in-vitro Tests) bzw. Direktuntersuchungen am Patienten selbst (reine in-vivo Tests) (19). In neueren Untersuchungen zur Gefrierkonservierung von Thrombozyten wird daher meist eine bestimmte Palette von Thrombozytentests gleichzeitig durchgeführt wie z.B.: Thrombozytenzählung vor und nach Transfusion zur Bestimmung des sogenannten korrigierten Increments =

Thrombozyten "nach Transfusion - vor Transfusion"
absolute Zahl transfundierter Thrombozyten

peroberfläche $\left[\frac{m^2}{mcl} \right]$, Thrombozytenüberlebenszeitmessungen nach Markierung mit ^{51}Cr , elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Bestimmung des Gehalts an Thrombozytengranula (dense bodies), biochemische Untersuchungen, Thrombozytenaggregationsmessungen, Blutungszeitmessungen u.v.m. (10/22/23/29/31/39). 1982 wurde die Resonanzthrombografie (2) als eine neue Methode zur Beurteilung der Effektivität frischer Thrombozytenkonzentrate beschrieben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bei einer Vielzahl von Methoden zur Gefrierkonservierung von Thrombozyten und ebenso einer Fülle von verschiedenartigen Testverfahren zur Beurteilung der hämostatischen Wirksamkeit gefrorener Thrombozyten die vergleichende Bewertung der einzelnen Methoden erheblich erschwert ist. Die Ergebnisse verschiedener Autoren bezüglich der in-vitro-recovery (= prozentualer Anteil der nach Transfusion in Zirkulation befindlichen Thrombozyten) liegt zwischen 40% und 50% (21/31). Die Tatsache, daß bislang die Gefrierkonservierung von Thrombozyten noch keinen Eingang in die routinemäßige klinische Anwendung gefunden hat, läßt bei einigen Autoren an der recht positiven Beurteilung ihrer Er-

gebnisse Zweifel aufkommen.

In eigenen Voruntersuchungen, bei denen als Frierschutz eine Kombination aus 4% HÄS und 2% DMSO verwandt wurde und außerdem unterschiedliche Vorgehensweisen (eingeeengte/nicht eingeeengte TKs, Lagerung bei $-80^{\circ}\text{C}/-150^{\circ}\text{C}$) versucht wurden, stellte sich heraus, daß zwar in-vitro noch durchaus eine gewisse Funktionsfähigkeit der Thrombozyten nachweisbar war, dagegen die in-vivo Testergebnisse im Vergleich zu denen von frischen TKs erheblich schlechter ausfielen. Der Thrombozytenverlust war bei den TKs, die nicht eingeeengt wurden, geringer, zudem fielen hier die in-vitro Tests vor Einfrieren der TKs besser aus als bei denen, die vorher eingeeengt wurden.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Zur Abklärung der bisher unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse wurden an der Medizinischen Klinik III, Abteilung für Transfusionsmedizin, Klinikum Großhadern der Universität München, in einer offenen Studie 12 Patienten frische TKs und 9 Patienten sequentiell gefrierkonservierte und frische TKs transfundiert. Die Gefrierkonservierung erfolgte dabei nach einem neuen Verfahren unter Verwendung von DMSO und Aprotinin (Trasylo^R) als Frierschutz. In einer reinen in-vitro Untersuchung wurden vorab 9 verschiedene Frierlösungen getestet. Nach Abschluß der Untersuchung sollte zu folgenden Fragen Stellung bezogen werden:

- 1) Welche Frierlösung liefert die brauchbarsten in-vitro Ergebnisse?
- 2) Mit welchem quantitativen und qualitativen Wirkungsverlust muß in-vitro und in-vivo bei Verwendung gefrierkonservierter TKs im Vergleich zu frischen TKs gerechnet werden?
- 3) Führt der klinische Einsatz friergelagerter TKs zu einer ausreichenden hämostaseologischen Verbesserung?

3. Patientengut, Material und Methoden

3.1. Transfusionsmodus

3.1.1. Auswahl der Patienten

Als Patientenkriterien für die Transfusion von gefrorenen bzw. frischen Thrombozytenkonzentraten im Rahmen der Untersuchungen galten folgende Grundsätze:

- a) Die Patienten sollten thrombozytopenisch sein ($< 30\,000$ Thrombozyten/ mm^3).
- b) Bei den Patienten sollten keine akuten Blutungen vorliegen, da andernfalls aufgrund des hohen Thrombozytenverbrauchs keine signifikanten Unterschiede in den durchzuführenden Tests vor und nach Transfusion zu erwarten sind.
- c) Die Patienten sollten bis dahin möglichst wenige Transfusionen erhalten haben (< 10 TKs, < 10 Tage vorher), um das Risiko einer Vorimmunisierung und damit einer a priori Wirkungslosigkeit der transfundierten Thrombozyten möglichst gering zu halten.
- d) Patienten mit einer Verbrauchskoagulopathie (DIC) wurden nicht für die Transfusionen herangezogen.

Entsprechend den erwähnten Auswahlkriterien setzte sich das Patientengut überwiegend aus Personen mit megakaryozytärer Insuffizienz bei Knochenmarksinfiltration durch maligne Erkrankungen oder unter zytostatischer Chemotherapie zusammen.

3.1.2. Transfusionskollektive

Bei einer Gesamtzahl von 23 verschiedenen transfundierten Patienten lassen sich entsprechend den verabreichten TKs

3 Gruppen von Transfusionen unterscheiden:

I) Transfusion frischer TKs

II) Transfusion friergelagerter TKs

III) Transfusion frischer TKs bei Patienten, denen zuvor friergelagerte TKs verabreicht wurden.

Kollektiv-Nr.	I	II	III
Zahl der Transfusionen	12	9	9
Einfriertemp.		-30°C	
Lagertemp.		-150°C	
Frierschutz		6% DMSO + Aprotinin	

Tab.1: Zusammenstellung der Transfusionskollektive

Bei Kollektiv I handelt es sich um Transfusionen frischer TKs, wobei jedem der 12 Patienten jeweils 1 frisches TK über einen Zeitraum von etwa 20 - 30 Minuten verabreicht wurde. Dieses Kollektiv diente zum einen dazu, die Unterschiede der Meßparameter vor und nach Transfusion zu erfassen, zum anderen dazu, Vergleichswerte für die Beurteilung der Wirksamkeit friergelagerter TKs zu erhalten. Das Kollektiv II umfaßt die Transfusionen von je 2 friergelagerten TKs bei 9 verschiedenen Patienten, denen zusätzlich 3 Stunden später noch jeweils 1 frisches TK vom gleichen Spender (= Kollektiv III) verabreicht wurde. Auf diese Weise war gewährleistet, daß bei möglicher Wirkungslosigkeit der friergelagerten TKs den Patienten eine suffiziente Therapie nicht vorenthalten wurde. Zudem erhielt man

weitere Vergleichswerte zwischen friergelagerten und frischen TKs, die außerdem unabhängig von Patient und Spender waren.

3.1.3. Blutabnahmen für Thrombozytentests

Jeweils unmittelbar vor und 3 Stunden nach Ende der Transfusion erfolgte aus einer peripheren Vene die Abnahme von 5 ml Blut (Vorgabe von 0,5 ml Na-Citrat in Einwegröhrchen). Bei den Blutabnahmen für die Thrombozytentests war darauf zu achten, nicht aus bereits liegenden Venenkathetern abzunehmen, da bereits geringste Heparinbeimengungen die weiter unten beschriebenen Tests wie RTG und TEG verfälschen.

3.2. Herstellung der Thrombozytenkonzentrate

3.2.1. Technik der Zellseparation

Die zum Einfrieren bzw. zur unmittelbaren Transfusion vorgesehenen TKs wurden mit Hilfe des Blutzellseparators CS-3000TM der Firma Fenwal gewonnen. Die Vorteile dieser Thrombozytenpräparationsmethode liegen zum einen in der Möglichkeit, von einem Einzelspender in einem knapp zweistündigen Zellseparationsvorgang eine hohe Thrombozytenausbeute zu erlangen, zum anderen darin, daß die unerwünschte Kontamination mit anderen korpuskulären Blutbestandteilen wie Erythrozyten und Leukozyten sehr gering gehalten werden kann (32/34/36).

3.2.2. Spenderauswahl und Verträglichkeit der Zellseparation

Als Thrombozytenspender kamen junge, gesunde Personen (bis 40 Jahre) in Frage, die in den Tagen vor der Zellseparation

keine Medikamente mit Einfluß auf die Thrombozytenfunktion, insbesondere keine acetylsalicylsäurehaltigen Präparate, eingenommen hatten. Die Verträglichkeit der Zellseparation seitens der Spender war in insgesamt etwa 140 Thrombozytenseparationsläufen gut; lediglich bei einer Spenderin traten nach Abschluß der Thrombozytenspende leichte Karpopedalspasmen auf, die wohl auf die stets vorhandene geringe ACD-Belastung der Spender zurückzuführen waren und die in diesem Fall durch die intravenöse Injektion einer Ampulle Calcium prompt behoben werden konnten.

3.2.3. Antikoagulation der Thrombozytenkonzentrate

Über ein in den Zellseparator integriertes, manuell steuerbares System wird während des gesamten Thrombozytenseparationslaufes kontinuierlich ACD in einer Gesamtmenge von ca. 300 - 350 ml zugeführt, was bei einem Gesamtdurchfluß von 3500 ml Blut einer ACD - Blut - Relation von etwa 1:10 entspricht. Das in dieser Weise eingebrachte ACD gelangt so zum Teil in den Thrombozytensammelbeutel und zum Teil in den Spenderkreislauf, wo das anfallende ACD in kurzer Zeit in der Leber verstoffwechselt wird.

3.2.4. Entnahme des Thrombozytensammelbeutels aus dem Zellseparator

Unmittelbar nach Entnahme des Thrombozytensammelbeutels aus der Zentrifuge des Zellseparators liegen die Plättchen in Form eines Sedimentes am Boden des Sammelbeutels, darüber befindet sich plättchenarmes Plasma (PAP). Durch kräftiges und beidhändiges Schütteln des Sammelbeutels für etwa 3 - 4 Minuten werden die Thrombozyten vollständig in

Resuspension gebracht und sind dann fertig für die Transfusion als frisches TK oder für die Weiterverarbeitung zum Zwecke des Einfrierens.

3.3.Einfriermethodik

3.3.1.Einengung des Thrombozytenkonzentrat-Volumens

In den Voruntersuchungen (vergleiche: Abschnitt 1, Seite 4 und 5) wurden die TKs, die nach Entnahme aus dem Zellseparator ein Nettogewicht von ca. 200 - 205 Gramm besitzen, durch Abpressen von PAP auf 50 Gramm eingeeengt. In den hier dargestellten Untersuchungen wurde jedoch das Prinzip der Einengung aus folgenden Gründen verlassen:

- a) Die Einengung erbrachte keinen Vorteil hinsichtlich der Thrombozytenintegrität nach Auftauen.
- b) Der Zentrifugationsprozess vor Einfrieren entfällt und folglich ist auch keine zusätzliche mechanische Alteration der Thrombozyten zu erwarten.
- c) Die Zeit, in der die Thrombozyten vor dem eigentlichen Einfrieren bei Raumtemperatur gehandhabt werden reduziert sich um ca. 2 Stunden.
- d) Es tritt kein zusätzlicher Thrombozytenverlust durch das Abpressen des PAP auf.

3.3.2.Frierlösungen

Nachdem eigene Voruntersuchungen, bei denen die Kombination aus DMSO (Endkonzentration: 2%) und HÄS (Endkonzentration: 4%) verwendet wurde (vergleiche Abschnitt 1, Seite 9), keine nennenswerten Erfolge gebracht hatten, wurde eine Serie verschiedener Frierlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, wobei für jede Frierlösung je 1 vollständige

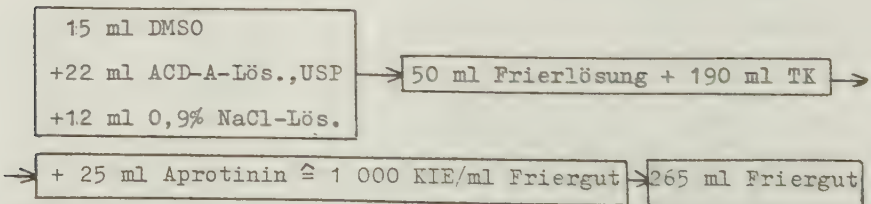
diges, frisches TK verwendet wurde (Tab.: 2).

Frierlösung	DMSO	HÄS	Glycerin	Aprotinin
1	2%	4%	-	1 000 KIE/ml
2	-	6%	-	-
3	-	6%	-	1 000 KIE/ml
4	-	-	6%	-
5	-	-	6%	1 000 KIE/ml
6	-	-	12%	-
7	-	-	12%	1 000 KIE/ml
8	6%	-	-	-
9	6%	-	-	1 000 KIE/ml

Tab.2: Frierlösungen

Der Proteinaseinhibitor Aprotinin (Trasylo^R) wurde zur Stabilisierung der Thrombozytenmembranen (vergleiche Abschnitt 1, Seite 6) sowohl mit der Frierlösung als auch mit der Waschlösung in einer Konzentration von 1 000 KIE/ml Friergut bzw. Waschgut zugegeben.

Für die Gefrierkonservierung des Kollektivs Nr. II (vergleiche Abschnitt 1, Seite 12) wurde die Frierlösung Nr. 9 verwendet. Sie wurde nach dem Schema der Tabelle 3 den einzelnen TKs zugesetzt.



Tab.3: Zusatz der Frierlösung Nr. 9 zum TK

Die einzelnen Frierschutzmedien wurden mit Hilfe von ACD-Auflösung, USP und physiologischer Kochsalzlösung auf ein Volumen von 50 ml eingestellt, um den osmotischen Stress auf die Thrombozyten während der Zugabe der Frierlösung, die über etwa 1/2 Stunde langsam tropfend auf der Konservenschaukel erfolgte, möglichst gering zu halten.

3.3.3. Einfrieren, Einfrier- und Lagertemperatur

Nach Zugabe der Frierlösung zum TK wird das gesamte Friergut in einem 500 ml - Gefrierbeutel (Fa. Gambro, Material: Kaptonfolie) umgefüllt, der das Einfrieren auch bei sehr niederen Temperaturen in der Regel schadlos übersteht. Das überschüssige Luftvolumen wird ausgedrückt, der Beutel verschweißt und in einen Aluminiumrahmen eingespannt, so daß eine gleichmäßige Beuteldicke von ca. 1,5 cm gewährleistet ist. Dieses Vorgehen ist unerläßlich, um ein gleichmäßiges Durchfrieren des Beutelinhaltes zu sichern. Zum Einfrieren wurde ein Kühlschrank mit -80°C verwendet; dabei wird eine durchschnittliche Frierrate von etwa $3^{\circ}/\text{Minute}$ erreicht. Nach Ablauf eines Tages wurden die Aluminiumrahmen entfernt und das Friergut bis zum Auftauen in der Gasphase von Flüssigstickstoff gelagert ($\hat{=}$ -150°C).

Zusätzlich wurden von jedem Thrombozytenspender 250 ml PAP, das simultan zur Thrombozytenseparation in einem gesonderten Beutel automatisch gesammelt wurde, bei -40°C eingefroren. PAP wurde sowohl für die Einstellung der Meßproben als auch als Zusatz für die Waschlösung benötigt.

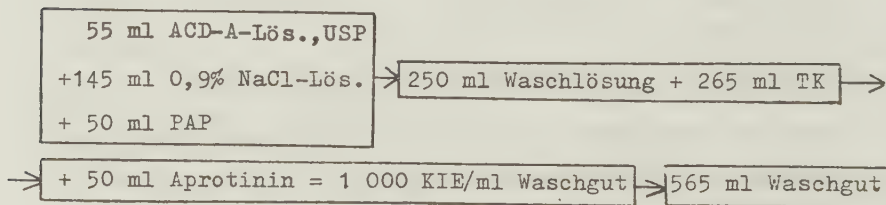
Es sei noch darauf hingewiesen, daß sämtliche Manipulationen an den TKs wie Umfüllen der Beutel, Abnahme der Meß-

proben und Zugabe der Frier- und Waschlösung unter sterilen Kautelen im laminar-flow erfolgten.

3.4.Vorbereitung friergelagerter TKs zur Transfusion

3.4.1.Auftauen und Waschen der TKs

Das Auftauen der TKs geschah zügig in einem Wasserbad mit 42°C über einen Zeitraum von etwa 3 Minuten, nachdem bereits zuvor das PAP des gleichen Spenders zur Herstellung der Waschlösung aufgetaut worden war. Nach Umfüllen des TK in einen 600 ml - Leerbeutel erfolgte die Zugabe der Waschlösung auf der Konservenschaukel über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten; anschließend wurden 50 ml Aprotinin (= 500 000 KIE) entsprechend einer Endkonzentration von etwa 1 000 KIE/ml Waschgut zugesetzt. Die Zusammensetzung und Menge der Waschlösung sind aus Tabelle 4 ersichtlich.



Tab.4: Zusatz der Waschlösung zum TK

Anschließend wurde das Waschgut für 15 Minuten bei 20°C mit 1 000 g zentrifugiert, der Überstand weitgehend abgepreßt und dem im Beutel verbleibenden Thrombozytensediment 100 ml PAP zugesetzt. Um eine vollständige Resuspension zu erreichen, wurde das TK für weitere 90 Minuten auf die Konservenschaukel gelegt.

3.4.2. Abnahme der Meßproben, Kennzeichnung der TKs

Sowohl vor Zugabe der Frierlösung als auch vor Transfusion wurden jeweils 10 ml Probenmaterial aus den TKs entnommen, ebenso wurden etwa 40 ml PAP zum Einstellen der Meßproben benötigt. Nach Anbringen eines Blutgruppenaufklebers mit den zugehörigen Daten wurden die aufgetauten TKs innerhalb 1 Stunde nach vollständig erfolgter Resuspension transfundiert. Die Übereinstimmung im ABO- und Rhesus-Blutgruppensystem ist zwar für Thrombozytentransfusionen nicht zwingend erforderlich (29), wurde aber trotzdem im Rahmen der vorliegenden Untersuchung strikt eingehalten.

3.5. Thrombozytentestmethoden

3.5.1. Problematik der Thrombozytentests

Die Tatsache, daß bislang kein Testverfahren existiert, mit dem eindeutig und umfassend die Thrombozytenfunktion erfaßt werden kann, führte zu dem Entschluß, durch die Kombination einer Reihe von Tests, die jeweils für sich nur Partialfunktionen der Thrombozyten widerspiegeln, zu einer hinreichenden Beurteilung frischer und friergelagerter TKs zu kommen. Im einzelnen wurden die in den folgenden Abschnitten dargestellten Testmethoden angewandt.

3.5.2. Thrombozytenzählung

Bestimmungen der Thrombozytenkonzentrationen und der absoluten Thrombozytenmengen in den TKs und in den Meßproben wurden nach der "Thrombo Plus"-Methode der Firma Sarstedt durchgeführt (34). Hierbei wird mittels einer Kapillare (20mcl/50mcl/100mcl) die Testprobe in eine hämolysierende Fertiglösung von 2 ml eingebracht, die Kapillare über ein

Mundstück ausgeblasen und die Lösung durch mehrmaliges Kippen durchmischt. Nach vollständiger Hämolyse der Erythrozyten wird eine Neubauer-Zählkammer mit der Meßprobe beschickt und für ca. 10 Minuten in eine feuchte Kammer gelegt, um eine vollständige Sedimentierung der Thrombozyten zu erreichen. Danach erfolgt die übliche Auszählung in der Neubauerkammer unter einem Phasenkontrastmikroskop und anschließende Multiplikation des Zählergebnisses mit dem entsprechenden Faktor (5000/2000/1000). Thrombozytenzählungen wurden zu folgenden Zwecken durchgeführt:

- a) Bestimmung der absoluten Thrombozytenmenge in den frisch hergestellten TKs.
- b) Einstellung der Meßproben für die übrigen Tests auf eine Thrombozytenkonzentration von $300\ 000/\text{mm}^3$. Die Einstellung aller Meßproben erfolgte mit dem Ziel, die Meßergebnisse von den unterschiedlichen Thrombozytenkonzentrationen, die in den TKs vor Einfrieren und nach Auftauen zu erwarten waren, unabhängig zu machen. Als Grundlage für die Einstellung einer beliebigen Meßprobe auf $300\ 000\ \text{Thrombozyten}/\text{mm}^3$ dienen folgende Formeln:
 - (1) $\frac{\text{Thrombozytenkonzentration der Meßprobe}/\text{mm}^3}{300\ 000/\text{mm}^3} = x$;
 - (2) $1\text{ml PRP} + (x - 1)\text{ml PAP} = x\text{ml eingestellte Meßprobe}$;
- c) Bestimmung der absoluten Thrombozytenmenge in den TKs nach Auftauen und Waschen.
- d) Bestimmung der Thrombozytenkonzentration bei den Patienten vor und jeweils 3 Stunden nach Transfusion.

3.5.3. Thrombelastographie (TEG) nach Hartert (13/14/15/19)

Für die vorliegende Untersuchung wurde der Thrombelasto-

graph der Firma Hellige, Freiburg, verwendet. Obgleich die Thrombelastographie (TEG) zu den Routinemethoden in der Blutgerinnungsdiagnostik zählt, sei hier nochmals kurz das Prinzip dieser Methode beschrieben, um den Unterschied zwischen der Thrombelastographie und der neu entwickelten Resonanzthrombographie (RTG, Abschnitt 3.5.4.) zu verdeutlichen. Durch die Messung der Scherelastizität des gerinnenden Blutes erlaubt das TEG die kontinuierliche Registrierung des Gerinnungsablaufs. Bei dieser Methode werden 0,3ml recalcifiziertes Blut oder eingestelltes plättchenreiches Plasma (0,3ml Blut oder PRP + 0,05ml CaCl_2) in eine Edelstahlküvette eingebracht, in die ein ebenfalls aus Edelstahl gefertigter Stempel eingetaucht wird. Durch langsames Hin- und Herdrehen der Küvette um die Längsachse wird bei zunehmender Scherelastizität des Gerinnsels ein Drehmoment auf den Stempel ausgeübt, das über einen Schreiber registriert wird. Die sich daraus ergebende thrombelastographische Kurve wird einerseits durch die Aktivität der Blutplättchen, andererseits durch die Geschwindigkeit, Quantität und Qualität des Fibrinaufbaus bestimmt, ohne daß sich jedoch diese beiden wesentlichen Parameter voneinander trennen lassen. Außerdem findet die Messung an einer stehenden Blutprobe statt, der die in vivo herrschenden rheologischen Eigenschaften fehlen.

Meßparameter der Thrombelastographie:

r = Reaktionszeit (min)

k = Gerinnselbildungszeit (min)

m_a = Maximalamplitude (mm)

$\max_E$ = maximale Thrombuselastizität = $\frac{100 \times m_a}{100 - m_a}$

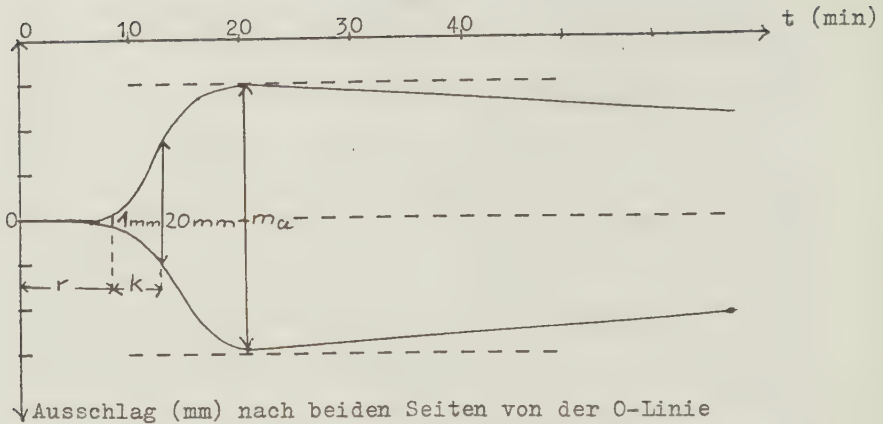


Abb.1: Auswertung des Thrombelastogramms (TEG)

3.5.4. Resonanzthrombographie (RTG) nach Hartert (15/16/17/18/20)

Für die vorliegende Untersuchung wurde der Resonanzthrombograph RTG 801 der Firma Fresenius, Oberursel, verwendet. Beim RTG handelt es sich um eine relativ neue Methode, die mit dem Ziel entwickelt wurde, die im Abschnitt 3.5.3. beschriebenen Nachteile des TEG auszuschalten. Bei dieser Methode werden ebenfalls in einer Edelstahlküvette 0,6 ml recalcifiziertes Blut oder eingestelltes PRP eingebracht (0,3ml Blut oder PRP + 0,3ml CaCl_2). Dem in die Küvette eintauchenden Stempel wird eine Orbitalbewegung aufgeprägt, um so die rheologischen Verhältnisse im fließenden Blut zu simulieren. Ein weiterer entscheidender Vorteil dieser Methode besteht darin, daß anhand der über den Schreiber registrierten Kurve der Gerinnungsablauf differenziert werden kann nach Aufbau des Fibrinnetzwerkes und dem Einfluß der Plättchenaktivität.

Meßparameter der Resonanzthrombographie:

r = Reaktionszeit (min)

f = Fibrinbildungszeit (min)

F = Fibrinamplitude

P = Plättchenamplitude (mm), 5 min nach Erreichen des peak

P_R = Plättchenindex = $10 \times \frac{P}{F}$

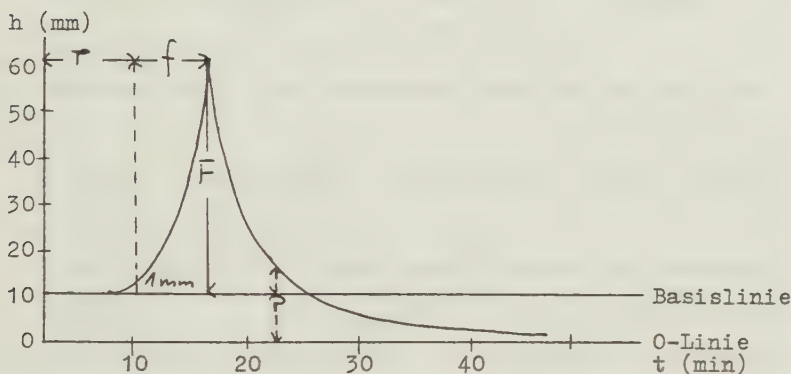


Abb.2: Auswertung der Resonanzthrombographie-Kurve

Sowohl die Meßkurven des RTG wie auch des TEG lassen zum Teil gleiche Schlüsse auf die gemessenen Gerinnungseigenschaften zu: Reaktionszeit (r) = Maß für die Gerinnungsbereitschaft. Das RTG gestattet aber darüber hinaus -wie oben angedeutet- die separate Erfassung der Fibrinbildungsphase (f) und des Einflusses der Thrombozyten auf den Gerinnungsablauf (P_R).

TEG- und RTG-Messungen wurden in den vorliegenden Untersuchungen stets parallel durchgeführt und zwar sowohl vor Einfrieren und nach Auftauen der TKs anhand von eingestelltem PRP ($300\,000$ Thrombozyten/ mm^3) als auch anhand von Blutproben der Patienten jeweils vor und 3 Stunden

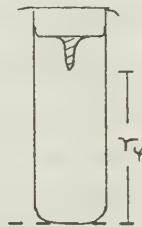
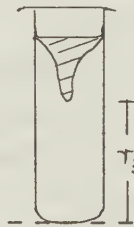
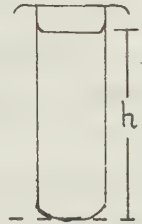
nach Transfusion.

3.5.5. Gerinnselretraktionsfähigkeit (19)

Zur Bestimmung der thrombozytenvermittelten Gerinnselretraktionsfähigkeit wurde eine modifizierte, quantitative Methode nach Breddin (42) verwendet. In der Originalmethode von Breddin, bei der auf eine standardisierte Thrombozytenzahl verzichtet wird, ist der Grad der Gerinnselretraktion von der Thrombozytenzahl und der Thrombozytenfunktion abhängig (semiquantitativer Test), außerdem wird das Ausmaß der Retraktion durch Vergleich der nach einer bestimmten Zeit (20, 60, 120 ...Min.) verbliebenen Serummenge zur ursprünglichen Menge des eingebrachten plättchenreichen Plasmas (PRP) ausgedrückt. Die Modifikation bestand zum einen in der Verwendung standardisierter Thrombozytenkonzentrationen ($300\ 000/\text{mm}^3$) und zum anderen in der Art der Auswertung der Gerinnselretraktion: es wurde jeweils nach entsprechenden Zeitabständen die Strecke r , um die sich das Gerinnsel retrahiert hatte, gemessen (siehe Abb.3). Im Testansatz werden 8,9 ml physiologische Kochsalzlösung und 0,1 ml Thrombinlösung (M + D Thrombin Reagenz, Merz und Dade) entsprechend 20 NIH-Einheiten in ein Glasröhrchen gegeben und nach Start einer Stoppuhr 1ml eingestelltes PRP zugesetzt. Das Glasröhrchen wird mit Parafilm verschlossen, zweimal gekippt und in ein Wasserbad von 37°C gestellt. Nach 1 - 2 Minuten wird das Plasmagerinnsel durch ruckartiges Drehen des Glasröhrchens um seine Längsachse von der Glaswand gelöst, so daß sich das Gerinnsel nun retrahieren kann. Nach 20, 60, 120 und eventuell 180 Minuten wird die Strecke, um

die sich das Gerinnsel retrahiert hat, gemessen und zur Gesamthöhe des Testansatzes im Glasröhrchen ins Verhältnis gesetzt.

0,1 ml M + D Thrombin (20 NIH-Einheiten) +
8,9 ml 0,9% NaCl-Lösung +
1 ml eingestelltes Citratplasma



h = Gesamthöhe

r = absolute Gerinnselretraktion in mm

$GR = \frac{r}{h} =$ relative Gerinnselretraktion in %

Abb.3: Testansatz und schematische Darstellung des Ablaufs der Gerinnselretraktion und Auswertung.

Gerinnselretraktionsmessungen wurden stets parallel zu den TEG- und RTG-Messungen an den TKs vor Einfrieren und nach Auftauen sowie am Citratplasma der von den Patienten abgenommenen Blutproben vor und nach Transfusion durchgeführt. Das plättchenhaltige Plasma aus den Blutproben der Patienten wurde durch Zentrifugation derselben in Kunststoffröhrchen bei 160 g für 5 Minuten und anschließendes Abheben des Überstandes gewonnen, wobei bei die-

sen Meßproben auf eine Einstellung der Thrombozytenzahl verzichtet wurde -wie auch bei den TEG- und RTG-Messungen aus dem Patientenblut- , da für eine Einstellung dieser Meßproben die Abnahme einer unzumutbar großen Menge Blutes notwendig gewesen wäre.

3.5.6.Thrombozytenaggregationstests (5/19)

Für die vorliegenden Untersuchungen kamen durchwegs induzierte Thrombozytenaggregationsmessungen mit dem Universalaggregometer der Firma Braun Melsungen zur Anwendung. Dieses Aggregometer setzt sich aus einem auf das Eppendorf-Photometer aufsetzbaren, heizbaren Metallblock und einem an das Photometer angeschlossenen Registriergerät zur Aufzeichnung des Extinktionsverlaufes während der Messung zusammen.

3.5.6.1.Prinzip der Aggregationsmessung

Zur Aufnahme der Meßproben dienten Kunststoffröhrchen (Küvetten) mit einem Innendurchmesser von 10 mm; die Messungen werden unter Verwendung eines Filters von 546 nm durchgeführt. Nach Eichung des Photometers und Abgleichung mit dem Registriergerät wird eine Küvette mit 1 ml PAP in den Strahlengang gebracht und das Photometer auf eine Transmission von 100% eingestellt, um unabhängig von der individuell etwas unterschiedlichen Trübung der verschiedenen Spenderplasmen eine konstante Ausgangsstellung am Photometer zu erreichen. Trotzdem können natürlich lipämische Plasmen nicht für vergleichende Messungen herangezogen werden, da hierbei die durch die Thrombozytenaggregation ausgelöste Extinktionsände-

rung infolge der ausgeprägten Plasmatrübung massiv überlagert wäre. Nach der Einstellung der Transmission auf 100% wird eine im Metallblock auf 37°C vorgewärmte Meßprobe desselben Spenders (1ml PRP, eingestellt auf 300 000 Thrombozyten/ml; 1 Magnetrührer mit den Abmessungen 2 x 5 mm in der Küvette) in den Strahlengang gebracht, der Magnetrührer eingeschaltet und die Transmission auf 10% eingestellt (= 90% Extinktion). Schließlich wird durch Zugabe einer bestimmten Menge einer aggregationsinduzierenden Substanz (siehe 3.5.6.2.) der Aggregationsvorgang ausgelöst und für etwa 10 Minuten aufgezeichnet. Nach einer kurzfristigen Extinktionszunahme kommt es dann in der Regel durch die Aggregation der Thrombozyten zu einer Extinktionsabnahme, die in Abhängigkeit von der Menge und Art des induzierenden Agens mehr oder weniger ausgeprägt, reversibel oder irreversibel sein kann. Um konstante Meßbedingungen zu gewährleisten, werden die aggregationsinduzierenden Substanzen vor Zugabe in einem Eiswasserbad aufbewahrt, die Meßproben selbst werden bei Raumtemperatur hergestellt und etwa 5 Minuten vor Beginn der Messung in dem erwähnten Metallblock auf 37°C erwärmt. Die Magnetrührer in den Meßproben stellen eine gleichmäßige Durchmischung des PRP mit dem aggregationsauslösenden Agens sicher und verhindern zudem ein Sedimentieren der Thrombozyten während des Meßvorgangs. Als Meßparameter diene das Ausmaß der maximalen Extinktionsänderung während der Messung:

$$\Delta E = E_1 - E_2$$

E_1 = Extinktionswert vor Zugabe des Aggregations-Induktors

E_2 = kleinster Extinktionswert während der Messung

Thrombozytenaggregationstests wurden an den Meßproben der TKs vor Einfrieren und nach Auftauen durchgeführt, nicht jedoch an Blutproben der Patienten vor und nach Transfusion, da hierfür die Abnahme unzumutbar großer Blutmengen erforderlich gewesen wäre.

3.5.6.2. Aggregationsinduzierende Substanzen

Mit den im folgenden beschriebenen Aggregations-Induktoren ADP, Collagen und Thrombin wurden Messungen in jeweils 3 verschiedenen Konzentrationen bei jedem TK vor Einfrieren und nach Auftauen durchgeführt, also insgesamt 9 Aggregationsmessungen je TK in frischem und friergelagertem Zustand.

3.5.6.2.1. ADP-induzierte Aggregation

Aus ADP-Pulver, das abgewogen zu 1mg bei -40°C gelagert wurde, wird durch Zugabe von 1ml physiologischer Kochsalzlösung eine Stammlösung hergestellt:

1 Mol ADP = 529,2 g/l = 529,2 mg/ml

1 mg ADP + 1 ml 0,9% NaCl-Lös. ergibt eine 188×10^{-5} molare Stammlösung

Werden nun 15 mcl dieser Stammlösung zu 1 ml PRP pipettiert, so ergibt sich im Testsystem eine ADP-Konzentration von:

$\frac{15 \text{ mcl ADP-Stammlös.}}{1000 \text{ mcl PRP}} \times 188 \times 10^{-5} \text{ molar} = 28 \times 10^{-6} \text{ molar}$

Durch weitere Verdünnung der Stammlösung im Verhältnis 1 : 2,5 und 1 : 10 erhält man die entsprechend niedrigeren Endkonzentrationen von $11,2 \times 10^{-6}$ und $2,8 \times 10^{-6}$ molar im Testsystem (Tab.5).

ADP-Konzentration	Meßproben-Ansatz	Testsystem
Stammlös. $\rightarrow 188 \times 10^{-5} \text{ m}$	$\rightarrow 15 \text{ mcl ADP} + 1 \text{ ml PRP} \rightarrow$	$28 \times 10^{-6} \text{ m}$
1 : 2,5 $\rightarrow 75 \times 10^{-5} \text{ m}$		$11 \times 10^{-6} \text{ m}$
1 : 10 $\rightarrow 18,8 \times 10^{-5} \text{ m}$		$2,8 \times 10^{-6} \text{ m}$

Tab.5: ADP-Molaritäten im Ansatz (Stammlösung/Verdünnungen) und im Testsystem

Der durch die Zugabe von jeweils 15 mcl ADP-Lösung zu 1 ml PRP entstehende geringfügige Verdünnungseffekt wurde aus praktischen Gründen vernachlässigt.

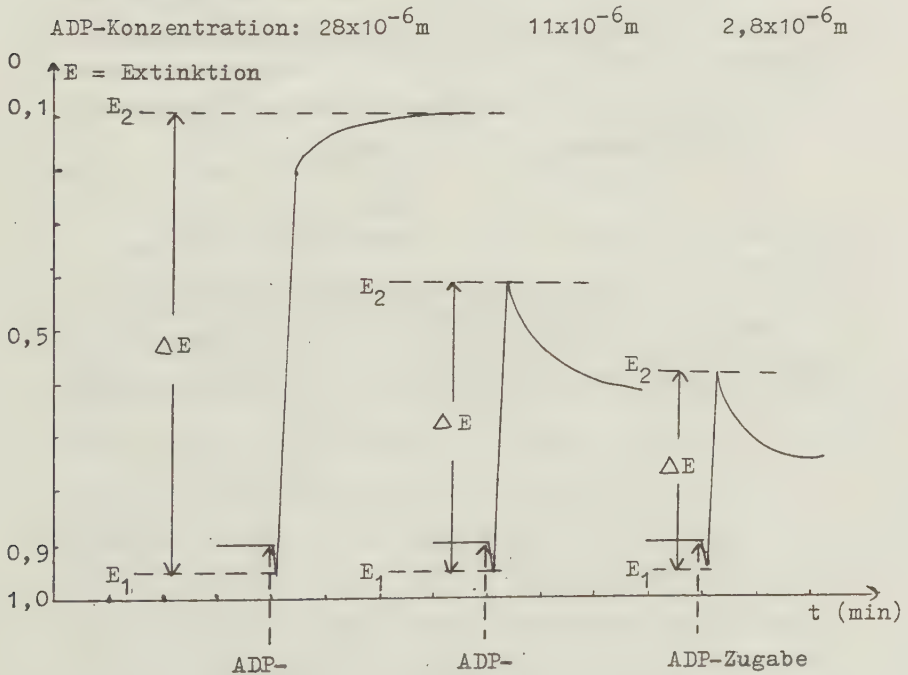


Abb.4: Schematisierte Beispiele ADP-induzierter Aggregationskurven

3.5.6.2.2.Collagen-induzierte Aggregation

Zur Messung der Collagen-induzierten Thrombozytenaggregation wurde das Collagenreagenz Horm^R der Firma Hormon Chemie, München, verwendet. Durch entsprechende Verdünnungen der im Handel erhältlichen Stammlösung gewinnt man die gewünschten Collagen-Konzentrationen 1mcg, 2,5mcg und 10mcg in jeweils 1 ml eingestellten PRP (Tab.6).

Collagen-Konzentration	Meßproben-Ansatz	Testsystem
Stammlös. → 1mg/ml →	10mcl Coll.+1ml PRP →	10mcg/ml
1 : 2 → 500mcg/ml →	5mcl Coll.+1ml PRP →	2,5mcg/ml
1 : 20 → 50mcg/ml →	50mcl Coll.+1ml PRP →	1mcg/ml

Tab.6: Collagen-Konzentrationen im Ansatz (Stammlösung und Verdünnungen) und im Testsystem

Auch bei den Messungen der Collagen-induzierten Aggregation wurde der geringfügige Verdünnungseffekt durch die Zugabe der Collagenlösungen zu den Meßproben (maximal 20mcl Coll.-Lösung auf 1 ml PRP) vernachlässigt.

Coll.-Konzentration:

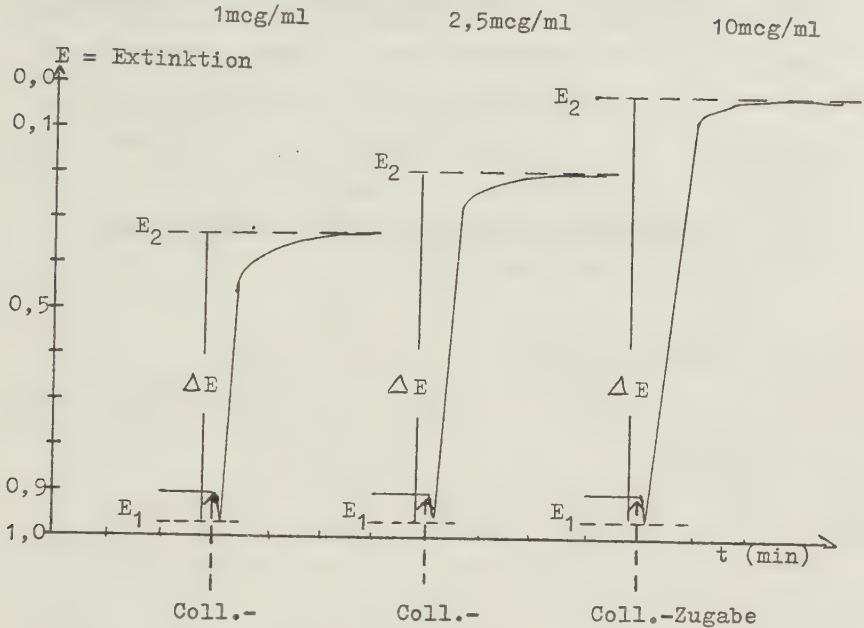


Abb.5: Schematisierte Beispiele Collagen-induzierter Aggregationskurven

3.5.6.2.3. Thrombin-induzierte Aggregation

Zur Messung der Thrombin-induzierten Thrombzytenaggregation wurde das sogenannte Test-Thrombin der Firma Behring, das als Trockensubstanz im Handel erhältlich ist, verwendet. Durch Auflösung der Trockensubstanz mit 1 ml Aqua dest. erhält man die Stammlösung mit einer Thrombinkonzentration von 30 IU/ml. Um die gewünschten Thrombinkonzentrationen von 0,15 IU, 0,30 IU und 0,45 IU je 1 ml PRP im Testsystem zu erreichen, werden entsprechend kleine Mengen aus der Stammlösung in die Meßproben eingebracht (Tab.7); der Verdünnungseffekt wird vernachlässigt.

Thrombin-Konzentration	Meßprobenansatz	Testsystem
Stammlös. = 30 IU/ml →	5mcl Thrombin+1ml PRP →	0,15IU/ml
" →	10mcl " +1ml PRP →	0,30IU/ml
" →	15mcl " +1ml PRP →	0,45IU/ml

Tab.7: Thrombin-Konzentration im Ansatz (Stammlösung)
und im Testsystem

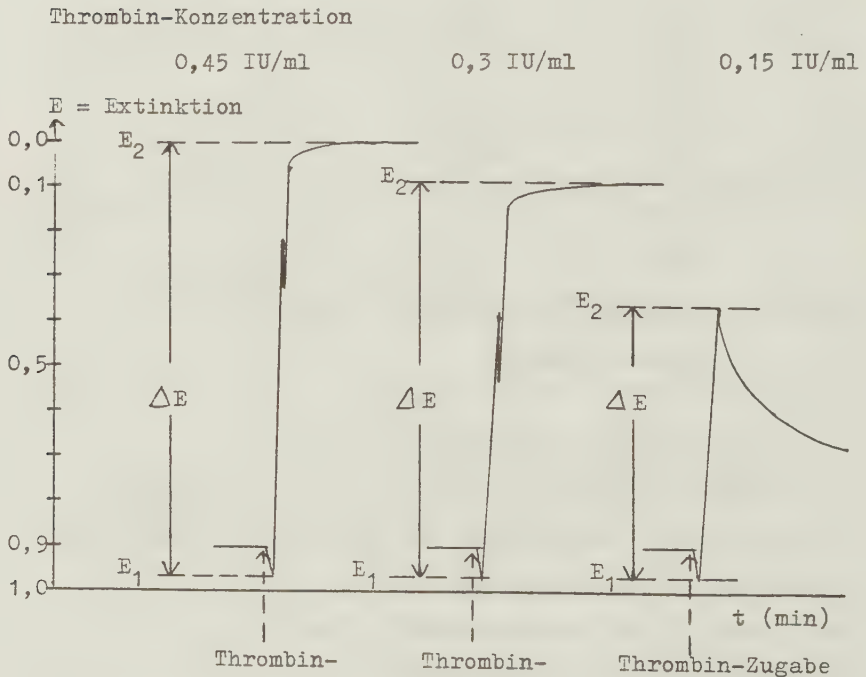


Abb.6: Schematisierte Beispiele Thrombin-induzierter
Aggregationskurven

Hinsichtlich der Thrombin-induzierten Thrombozyten-
aggregation ist erwähnenswert, daß es nach der primären
Thrombozytenaggregation und der anschließend mehr oder

weniger stark ausgeprägten Desaggregation zu einer vollständigen plasmatischen Gerinnung kommt, wobei sich der Gerinnungsthrombus um den Magnetrührer am Boden der Küvette anlagert und dadurch die Extinktion noch weiter abnimmt. Bei der Auswertung wurde allerdings ebenso wie bei der ADP- und Collagen-induzierten Aggregation der Extinktionsunterschied $\Delta E = E_1 - E_2$ herangezogen.

4. Ergebnisse

4.1. In-vitro Ergebnisse verschiedener Frierlösungen

In den Tabellen 8, 9, 10 und 11 sind die Testergebnisse unter Verwendung von 9 verschiedenen Frierlösungen (siehe Tab.2) zusammengestellt.

Frierlösung	DMSO	HÄS	Glycerin	Aprotinin
1.	2%	4%	-	1 000 KIE/ml
2	-	6%	-	-
3	-	6%	-	1 000 KIE/ml
4	-	-	6%	-
5	-	-	6%	1 000 KIE/ml
6	-	-	12%	-
7	-	-	12%	1 000 KIE/ml
8	6%	-	-	-
9	6%	-	-	1 000 KIE/ml

Tab.2: Frierlösungen

Für jeden Untersuchungsgang wurde 1 vollständiges, frisches Thrombozytenkonzentrat eines Einzelspenders herangezogen und nach den in Abschnitt 3 dargestellten Verfahren behandelt und untersucht. Beim RTG und TEG wird nur der Plättchenindex (P_R) bzw. die maximale Thrombuselastizität (max_E) aufgeführt, da allein diese Parameter Aussagen über die Thrombozytenfunktion erlauben.

4.1.1. Frierlösungen 1, 2 und 3

Bei dem mit Frierlösung 2 (6% HÄS/ohne Aprotinin) behandelten TK zeigten sich unmittelbar nach Auftauen zahlreiche Mikroaggregate, die sich jedoch nach Zuga-

be der Waschlösung und Waschen sowie Resuspension des Thrombozytensedimentes mit 100 ml PAP vollständig auflösen.

Frierlös.	1		2		3	
	a	b	a	b	a	b
Thrombos $\times 10^{11}/TK$	4,57	1,94	4,10	1,69	4,06	1,43
RTG: P_R	1,13	3,39	1,45	11,67	1,08	10,91
TEG: max_E	186	100	92	42	108	44
Gerinnssel- 20'	38 ‰	19 ‰	36 ‰	4 ‰	45 ‰	14 ‰
retr.: 60'	68 ‰	35 ‰	71 ‰	20 ‰	75 ‰	25 ‰
120'	81 ‰	43 ‰	84 ‰	34 ‰	86 ‰	41 ‰
ADP-Aggr. $2,8 \times 10^{-6}m$	0,05	0,01	0,26	0,00	0,08	0,00
(ΔE) $11,2 \times 10^{-6}m$	0,17	0,01	0,51	0,00	0,27	0,00
$28 \times 10^{-6}m$	0,19	0,04	0,51	0,01	0,45	0,02
Coll. Aggr. 1mcg/ml	0,56	0,01	0,21	0,00	0,12	0,00
(ΔE) 2,5mcg/ml	0,62	0,03	0,52	0,00	0,57	0,00
10mcg/ml	0,65	0,08	0,55	0,02	0,60	0,02
Thrombin- 0,15IU/ml	0,18	0,01	0,36	0,00	0,08	0,00
Aggr. 0,30IU/ml	0,45	0,02	0,49	0,00	0,27	0,00
(ΔE) 0,45IU/ml	0,49	0,03	0,42	0,00	0,48	0,00

Tab.8: In-vitro Testergebnisse der Frierlösungen 1, 2 und 3. a = Meßergebnisse an frischen Thrombozyten, b = Meßergebnisse nach Frierlagerung der Thrombozyten.

4.1.2.Frierlösungen 4 und 5

Frierlösung	4		5	
	a	b	a	b
Thrombos x 10 ¹¹ /TK	3,57	1,97	2,96	1,16
RTG: P _R	1,04	12,95	1,47	12,07
TEG: max _E	141	30	120	46
Gerinnsel- 20'	40 %	0 %	39 %	1 %
retr.: 60'	77 %	5 %	72 %	14 %
120'	82 %	15 %	82 %	26 %
ADP-Aggr. 2,8x10 ⁻⁶ m	0,08	0,00	0,22	0,00
(ΔE) 11,2x10 ⁻⁶ m	0,26	0,00	0,37	0,00
28 x10 ⁻⁶ m	0,46	0,00	0,58	0,00
Coll.-Aggr. 1mcg/ml	0,60	0,00	0,52	0,00
(ΔE) 2,5mcg/ml	0,67	0,00	0,58	0,00
10mcg/ml	0,67	0,00	0,63	0,00
Thrombin- 0,15IU/ml	0,23	0,00	0,07	0,00
Aggr. 0,30IU/ml	0,51	0,00	0,29	0,00
(ΔE) 0,45IU/ml	0,60	0,00	0,43	0,00

Tab.9: In-vitro Testergebnisse der Frierlösungen 4 und 5. a = frische Thrombozyten, b = frier-
gelagerte Thrombozyten

Sowohl das mit Frierlösung 4 (6% Glycerin, ohne Aprotinin) als auch das mit Frierlösung 5 (6% Glycerin, mit Aprotinin) behandelte TK wurde in Flüssigstickstoff eingefroren und gelagert; dies entspricht im Prinzip dem für die Gefrierkonservierung von Erythrozytenkonzentraten üblichen Vorgehen (low-dose/high-rate). Bei beiden in Tabelle 9

aufgeführten TKs zeigten sich nach dem Auftauen einige Mikroaggregate, die auch nach dem Waschen und der Resuspension des Thrombozytensedimentes sich nicht mehr auflösten.

4.1.3. Frierlösungen 6 und 7

Frierlösung	6		7	
	a	b	a	b
Thrombos $\times 10^{11}/\text{TK}$	4,03	1,23	3,60	1,20
RTG: P_R	1,38	11,99	1,09	12,16
TEG: $\max_E$	156	54	144	45
Gerinnssel- 20'	32 %	0 %	42 %	0 %
retr.: 60'	64 %	11 %	74 %	10 %
120'	77 %	18 %	84 %	20 %
ADP-Aggr. $2,8 \times 10^{-6} \text{m}$	0,26	0,00	0,09	0,00
(ΔE) $11,2 \times 10^{-6} \text{m}$	0,48	0,00	0,18	0,00
$28 \times 10^{-6} \text{m}$	0,48	0,00	0,16	0,00
Coll.-Aggr. 1mcg/ml	0,44	0,00	0,10	0,00
(ΔE) $2,5 \text{mcg/ml}$	0,51	0,00	0,57	0,00
10mcg/ml	0,55	0,00	0,66	0,00
Thrombin- $0,15 \text{IU/ml}$	0,11	0,00	0,05	0,00
Aggr. $0,30 \text{IU/ml}$	0,29	0,00	0,29	0,00
(ΔE) $0,45 \text{IU/ml}$	0,40	0,00	0,49	0,00

Tab.10: In-vitro Testergebnisse der Frierlösungen 6 und 7. a = frische Thrombozyten, b = frier-
gelagerte Thrombozyten.

Die TKs, die mit den Frierlösungen 6 bzw. 7 (12 % Glyce-

rin, ohne bzw. mit Aprotinin) behandelt wurden, wurden entsprechend der Einfriermethodik von Erythrozytenkonzentraten bei -80°C (high-dose/low-rate) eingefroren. In beiden TKs waren unmittelbar nach Auftauen Mikroaggregate vorhanden -in dem mit Aprotinin behandelten TK weniger als in dem ohne Aprotinin-; in beiden Fällen jedoch waren diese Mikroaggregate nach dem Waschen der TKs verschwunden.

4.1.4.Frierlösungen 8 und 9

Frierlösung	8		9	
	a	b	a	b
Thrombos $\times 10^{11}/\text{TK}$	2,95	1,42	4,16	2,44
RTG: P_R	1,32	1,78	1,48	1,36
TEG: $\max_E$	122	100	147	138
Gerinnssel- 20'	33 %	26 %	42 %	35 %
retr. 60'	68 %	45 %	74 %	54 %
120'	83 %	59 %	83 %	69 %
ADP-Aggr. $2,8 \times 10^{-6}_m$	0,27	0,04	0,13	0,11
(ΔE) $11,2 \times 10^{-6}_m$	0,55	0,07	0,51	0,14
$28 \times 10^{-6}_m$	0,58	0,11	0,52	0,20
Coll.-Aggr. 1mcg/ml	0,54	0,04	0,60	0,05
(ΔE) 2,5mcg/ml	0,56	0,06	0,59	0,14
10mcg/ml	0,62	0,19	0,62	0,20
Thrombin- 0,15IU/ml	0,12	0,06	0,22	0,04
Aggr. 0,30IU/ml	0,35	0,08	0,51	0,09
(ΔE) 0,45IU/ml	0,47	0,10	0,50	0,13

Tab.11: In-vitro Testergebnisse der Frierlösungen 8 und 9. a = frische Thrombozyten, b = frier-
gelagerte Thrombozyten.

Die Tatsache, daß bei dem mit Frierlösung 9 (6% DMSO, mit Aprotinin) behandelten TK der Plättchenindex P_R mit 1,36 nach Auftauen und Waschen besser erscheint als vor dem Einfrieren ($P_R = 1,48$) läßt mehrere Erklärungsmöglichkeiten zu:

- a) Streuwert im Rahmen der Meßungenauigkeit des RTG
- b) Es ist denkbar, daß es durch die Zentrifugation beim Waschen des TK zu einer Selektion der besser erhaltenen Thrombozyten kommt (die durch die Gefrierkonservierung stärker geschädigten Thrombozyten verbleiben im Überstand und werden verworfen) und folglich auch einzelne Meßparameter durchaus nach Auftauen und Waschen besser ausfallen können als vor dem Einfrieren. Dessen ungeachtet muß jedenfalls festgestellt werden, daß sich die mit dem RTG erfaßte Thrombozytenfunktion durch die Gefrierkonservierung so gut wie nicht geändert hat.

4.1.5.Synopsis der Meßergebnisse der 9 verschiedenen Frierlösungen

Die in der Tabelle 12 dargestellte Synopsis der Testergebnisse der 9 verschiedenen Frierlösungen ergibt sich durch die weitere Auswertung der in den Tabellen 8, 9, 10 und 11 gegenübergestellten Meßwerte vor Einfrieren der TKs einerseits sowie nach Auftauen und Waschen der TKs andererseits (Spalte a = vor Einfrieren, Spalte b = nach Waschen). Die Thrombozytenausbeute (recovery), die Gerinnselretraktion und die verschiedenen Aggregationsmessungen werden als prozentualer Anteil der Meßergebnisse nach Auftauen und Waschen im Vergleich zu den entsprechenden Meßwerten vor Einfrieren angegeben: $\frac{b}{a} \times 100 (\%)$.

Frierlösung	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Thrombozyten- ausbeute (%)	42	41	35	55	39	31	33	48	59
P_R -Differenz a - b	2,26	10,22	9,83	11,91	11,60	10,61	11,07	0,46	-0,12
$\max_E$ -Differenz a - b	86	50	64	111	74	102	99	22	9
Gerinnsselretr. 20'	50	11	31	0	3	0	0	79	83
$\frac{b}{a} \times 100$ (%)	51	28	33	6	19	17	14	66	73
120'	53	40	48	18	32	23	24	71	83
ADP-Aggr. $2,8 \times 10^{-6} M$	20	0	0	0	0	0	0	15	85
$11,2 \times 10^{-6} M$	6	0	0	0	0	0	0	13	27
$\frac{b}{a} \times 100$ (%)	21	2	4	0	0	0	0	19	38
$28 \times 10^{-6} M$									
Coll.-Aggr. 1mcg/ml	2	0	0	0	0	0	0	7	8
$2,5 mcg/ml$	5	0	0	0	0	0	0	11	24
$\frac{b}{a} \times 100$ (%)	12	4	3	0	2	0	0	31	32
$10 mcg/ml$									
Thrombin- 0,15IU/ml	6	0	0	0	0	0	0	50	18
Aggr. 0,30IU/ml	4	0	0	0	0	0	0	23	18
$\frac{b}{a} \times 100$ (%)	6	0	0	0	0	0	0	21	26
$0,45 IU/ml$									

Tab.12: Synopsis der Testergebnisse der 9 verschiedenen Frierlösungen. a = vor Einfrieren, b = nach Auftauen und Waschen.

Je größer die so erhaltenen Prozentwerte sind, um so weniger weichen die Meßergebnisse nach Gefrierkonservierung von den Ausgangswerten vor dem Einfrieren ab und um so geringer ist auch die Schädigung der Thrombozyten durch den

Einfrier-, Auftau- und Waschprozeß zu veranschlagen. Beim Plättchenindex des RTG (P_R) und der maximalen Thrombuselastizität des TEG ($\max_E$) werden jeweils die absoluten Differenzwerte der Meßergebnisse vor Einfrieren und nach Auftauen angegeben: $|a - b|$. Je kleiner diese Differenzwerte ausfallen, um so geringer ist auch die durch die Gefrierkonservierung hervorgerufene Schädigung der Thrombozyten anzunehmen. Die möglichen Gründe für die Tatsache, daß sich bei dem mit der Frierlösung 9 behandelten TK eine negative P_R -Differenz von $-0,12$ ergibt, wurden bereits im Abschnitt 4.1.4. (Seite 39) angegeben.

4.2. In-vitro Testergebnisse der transfundierten TKs

In der Tabelle 13 sind die in-vitro Testergebnisse aller transfundierten TKs -nach 3 Gruppen geordnet- zusammengefaßt. In der Spalte der Gruppe I sind die Mittelwerte der Meßergebnisse von 12 TKs dargestellt, die in frischem Zustand 12 verschiedenen Patienten (= Kollektiv I, vergleiche Seite 12) transfundiert wurden. Die Gruppe II umfaßt 18 TKs (je 2 TKs/Spender), die mit der Frierlösung 9 behandelt und nach der im Abschnitt 3 beschriebenen Methodik eingefroren, gelagert und aufgetaut wurden. In der Spalte a erscheinen die Mittelwerte der Meßergebnisse vor Einfrieren, in der Spalte b die entsprechenden Meßergebnisse nach Auftauen und Waschen. Je 2 TKs vom selben Spender wurden insgesamt 9 verschiedenen Patienten transfundiert (= Kollektiv II, Seite 12). Die 7 TKs der Gruppe III wurden in frischem Zustand 7 verschiedenen Patienten transfundiert (= Kollektiv III, Seite 10), die 3 Stunden zuvor je 2 friergelagerte TKs erhalten hatten.

TKs der Gruppe	I	II		III
n / Lagerdauer (Tage)	12	18/ 36 Tage		7
	a	a	b	a
Thrombos $\times 10^{11}/TK$	3,91	3,96	2,00	3,69
RTG: P_R	1,34	1,40	2,63	1,49
TEG: max_E	148	141	94	127
Gerinnsel- 20'	38 %	39 %	28 %	36 %
retr. 60'	67 %	69 %	52 %	67 %
120'	79 %	82 %	63 %	80 %
ADP-Aggr. $2,8 \times 10^{-6}m$	0,19	0,14	0,04	0,16
(ΔE) $11,2 \times 10^{-6}m$	0,38	0,27	0,08	0,35
$28 \times 10^{-6}m$	0,48	0,42	0,12	0,46
Coll.-Aggr. 1mcg/ml	0,32	0,40	0,03	0,38
(ΔE) 2,5mcg/ml	0,54	0,55	0,04	0,44
10mcg/ml	0,62	0,63	0,15	0,53
Thrombin- 0,15IU/ml	0,12	0,15	0,03	0,13
Aggr. 0,30IU/ml	0,32	0,42	0,07	0,39
(ΔE) 0,45IU/ml	0,42	0,49	0,10	0,46

Tab.13: Mittelwerte der TK-Gruppen I, II und III (Gruppe I und III = Frisch-TKs, Gruppe II = friergelagerte TKs). a = frische Thrombozyten, b = friergelagerte Thrombozyten.

4.3.In-vivo Testergebnisse der transfundierten Patienten

4.3.1.Kollektiv I, Transfusion frischer TKs

12 verschiedenen Patienten wurde jeweils 1 frisches TK eines Einzelspenders verabreicht. Im folgenden werden zunächst anamnestische Angaben zu den einzelnen Patienten nach folgendem Schema aufgeführt: Patienten-Nr., Initialen,

Alter, Diagnose (bzw. Arbeitsdiagnose), Körpergröße, -gewicht und -oberfläche sowie früher erhaltene Transfusionen (TK = Thrombozytenkonzentrat, GK = Granulozytenkonzentrat, EK = Erythrozytenkonzentrat).

Patient 1: W.H., 40 J, akute Leukose, 168 cm, 53 kg,
1,58 m², 4 TK, 19 EK

Patient 2: S.K., 54 J, akute myeloische Leukämie, 180 cm,
75 kg, 1,93 m², 20 TK, 6 GK, 20 EK

Patient 3: H.J., 30 J, akute myeloische Leukämie, 176 cm,
59 kg, 1,71 m², 5 TK, 2 EK

Patient 4: H.M., 65 J, Mitralvitium (fragliche Blutung),
148 cm, 53 kg, 1,45 m², 4 TK, 10 EK

Patient 5: W.H., 40 J, akute Leukose, 168 cm, 53 kg,
1,58 m², 8 TK, 25 EK

Patient 6: M.H., 46 J, chronisch myeloische Leukämie,
180 cm, 73 kg, 1,91 m², 3 TK, 6 EK

Patient 7: W.M., 71 J, chronisch myeloische Leukämie,
156 cm, 46 kg, 1,41 m², 6 TK, 20 EK

Patient 8: B.S., 38 J, Morbus Hodgkin, 169 cm, 60 kg,
1,68 m², 2 TK, 2 EK

Patient 9: F.J., 39 J, lymphoblastisches Lymphom, 183 cm,
89 kg, 2,11 m², nicht vortransfundierte

Patient 10: M.R., 54 J, metastasierendes Mamma-Carcinom,
162 cm, 60 kg, 1,62 m², 1 TK, 2 EK

Patient 11: H.H., 32 J, akute lymphatische Leukämie, 168 cm,
65 kg, 1,73 m², nicht vortransfundierte

Patient 12: R.A., 30 J, akute Leukose, 161 cm, 59 kg,
1,61 m², 5 TK, 10 EK

Patient-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Thrombozytenwert des Pat. (mcl ⁻¹)	a 20000 b 16000	16000 20000	40000 62000	28000 64000	24000 22000	10000 18000	10000 24000	12000 22000	16000 38000	104000 170000	34000 84000	16000 62000
RTG: P _R	a 10,65 b 10,36	10,05 5,88	11,32 5,75	4,17 2,48	6,87 9,11	10,93 9,76	14,55 9,09	11,08 9,19	31,48 22,50	6,15 2,53	4,12 2,41	12,00 4,84
TEG: max _E	a 67 b 68	61 72	41 59	85 100	77 59	14 27	37 92	30 36	154 178	- 199	108 133	- -
Gerinnungs- 20'	a 1 b 0	1 5	9 18	11 16	5 7	0 7	0 7	5 12	0 4	11 16	7 11	0 1
retr. (%)	a 11 b 7	9 29	44 54	27 34	13 26	7 35	3 15	11 29	5 15	21 32	21 28	3 11
120'	a 15 b 13	21 46	74 76	36 49	33 46	14 60	5 21	21 45	8 17	25 42	32 38	5 17
180'	a 21 b 18	26 53	79 84	43 57	56 53	16 69	7 25	41 47	9 17	29 48	39 42	13 24
Thrombos x 10 ¹¹ je transf. TK	3,86	3,10	4,69	4,14	4,20	3,71	3,34	4,58	3,80	3,52	4,52	3,48
Kogr. Increment ($\frac{m}{mcl} \times 10^{-8}$)	0	2,49	8,02	12,61	0	4,12	5,91	3,67	12,22	30,38	19,13	21,22
HIA-crossmatch + = positiv, - = negativ, n. = nicht durchgeführt	+	-	-	-	+	-	-	-	-	n.	n.	-

Tab.14: In-vivo Testergebnisse bei 12 Patienten, die je 1 frisches TK erhielten. a = vor Transfusion, b = 3 Std. nach Ende der Transfusion. Zusatzdaten im unteren Teil der Tabelle (siehe Erläuterungen im Text).

In der Tabelle 14 sind neben den in-vivo Testergebnissen folgende zusätzliche Daten aufgeführt:

- a) absolute Thrombozytenmenge der einzelnen transfundierten TKs.
- b) korrigiertes Increment = $\frac{\text{Thrombozytenanstieg}}{\text{verabreichte Thrombozytenmenge}} \times \text{Körperoberfläche des Patienten} \left(\frac{\text{m}^2}{\text{mcl}} \right)$; vergleiche Abschnitt 1, Seite 8). Dieser rechnerisch ermittelte Zahlenwert macht die Transfusionsergebnisse bei den verschiedenen Patienten dadurch miteinander vergleichbar, daß der Thrombozytenanstieg eines Patienten jeweils zu dessen Körperoberfläche und zur verabreichten Thrombozytenmenge in Beziehung gesetzt wird.
- c) HLA-crossmatch: Wenngleich für die Untersuchungen in der Regel Patienten ausgewählt wurden, die bis dahin möglichst wenige Transfusionen erhalten hatten, sollte trotzdem durch das sogenannte HLA-crossmatch, einen Lymphozyto-toxizitätstest, das Vorliegen von Antikörpern gegen Spenderantigene ausgeschlossen bzw. bestätigt werden. In der Tat wurde bei Patient 1 und 5 ein positiver HLA-crossmatch gefunden; ein Thrombozytenanstieg stellte sich erwartungsgemäß bei diesen Patienten nach Transfusion je eines frischen TKs nicht ein; beide Patienten zeigten keinerlei Anzeichen einer Unverträglichkeit der Transfusion im Sinne einer Transfusionsreaktion.

4.3.2. Kollektiv II, Transfusion friergelagerter TKs

9 verschiedenen Patienten wurden jeweils 2 friergelagerte, mit der Frierlösung 9 behandelte (vergleiche Abschnitt 5.3.2. Seite 16) TKs des gleichen Spenders unmittelbar hinterein-

ander verabreicht. Entsprechend dem Abschnitt 4.3.1. werden zunächst anamnestische Angaben zu den einzelnen Patienten aufgeführt sowie in der Tabelle 15 die in-vivo Testergebnisse und entsprechende Zusatzdaten dargestellt.

Patient 1: R.G., 66 J, Präleukose, 162 cm, 54 kg, $1,56 \text{ m}^2$,
5 TK, 24 EK

Patient 2: O.A., 38 J, akute Leukose, 166 cm, 62 kg,
 $1,68 \text{ m}^2$

Patient 3: S.A., 62 J, V.a. Haarzellenleukämie, 164 cm,
78 kg, $1,84 \text{ m}^2$, 1 TK

Patient 4: W.R., 56 J, malignes Lymphom, 166 cm, 73 kg,
 $1,81 \text{ m}^2$, 3 TK, 26 EK, moribunder Patient

Patient 5: H.J., 29 J, Thymuscarcinom, 186 cm, 83 kg,
 $2,06 \text{ m}^2$, 1 TK, 2 EK

Patient 6: P.H., 53 J, Leukämie, 165 cm, 83 kg, $1,90 \text{ m}^2$,
4 TK, 4 EK

Patient 7: S.F., 74 J, lymphoblastisches Lymphom, 156 cm,
 62 kg , $1,61 \text{ m}^2$, 3 TK, 3 EK

Patient 8: R.R., 72 J, chronisch lymphatische Leukämie,
165 cm, 54 kg, $1,58 \text{ m}^2$, 5 EK

Patient 9: M.A., 35 J, akute Leukose, 184 cm, 83 kg,
 $2,06 \text{ m}^2$, 10 TK, 12 EK

Bei Patient 1 trat etwa 1,5 Stunden nach der Transfusion der beiden friergelagerten TKs starker Schüttelfrost auf; ein Thrombozytenanstieg blieb trotz der Verabreichung von $5,28 \times 10^{11}$ Thrombozyten aus (vergleiche Tabelle 15). Der am Folgetag ausgewertete HLA-crossmatch war bei diesem Patienten po-

Patient-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Thrombozytenwerte des Patienten (mcl ⁻¹)	a	10000	32000	38000	4000	22000	8000	22000	18000
	b	8000	42000	70000	6000	50000	16000	32000	18000
RTG: PR	a	12,72	8,36	5,81	17,74	6,73	13,51	10,03	10,32
	b	12,77	4,47	4,00	-	4,63	12,33	7,46	8,81
TEG: max _E	a	20	39	111	64	113	37	32	113
	b	18	61	96	-	82	79	42	108
Gerinninselre- traktion (%)	20'	a	1	8	0	8	0	7	15
	60'	b	1	9	0	11	0	12	15
120'	a	4	20	15	0	17	3	19	29
	b	5	25	27	0	20	8	28	32
180'	a	9	27	31	3	27	7	36	45
	b	9	36	38	0	34	15	40	49
Thrombozyten x 10 ¹¹ beider friergel. TKs	a	13	29	39	4	32	9	47	51
	b	12	43	45	0	42	19	51	54
korrigiertes Increment ($\frac{m^2}{mcl} \times 10^{-8}$)		5,28	4,12	4,38	4,80	4,53	3,02	3,40	3,05
HLA-crossmatch, + = po- sitiv, - = negativ, n. = nicht auswertbar		0	4,08	13,44	0,75	12,73	5,03	4,74	9,32
		+	-	-	n.	-	-	-	-

Tab.15: In-vivo Testergebnisse bei 9 Patienten, die je 2 friergelagerte TKs erhielten. a = vor Transfusion, b = 3 Std. nach Ende der Transfusion. Zusatzdaten entsprechend Tab. 14.

sitiv. Bei Patient 4 waren das RTG und das TEG nach Transfusion sowie der HLA-crossmatch aus technischen Gründen nicht auswertbar. Dieser Patient befand sich in moribundem Zustand; der Thrombozytenanstieg nach Transfusion der beiden friergelagerten TKs war nur unbedeutend. Der Patient 7 verspürte unter der Transfusion der friergelagerten TKs wie auch später unter der Transfusion eines frischen TK vom selben Spender leichte Atemnot; der HLA-crossmatch war negativ. Bei Patient 9 kam es trotz negativem HLA-crossmatch zu keinem Thrombozytenanstieg 3 Stunden nach Transfusion.

4.3.3. Kollektiv III, Transfusion frischer TKs bei den Patienten des Kollektiv II

Bei Kollektiv III handelt es sich um die Transfusion je eines frischen TK bei Patienten, die 3 Stunden zuvor je 2 friergelagerte TKs erhalten haben (= Kollektiv II; vergleiche Seite 12). Sowohl die beiden friergelagerten TKs als auch das frische TK stammten hierbei jeweils von ein und demselben Spender. Bei Patient 1 des Kollektiv II wurde auf die Transfusion eines frischen TK verzichtet, da wegen starken Schüttelfrostes auf die friergelagerten TKs hin das Vorliegen antithrombozytärer Antikörper gegen die vorgesehenen Spenderthrombozyten anzunehmen war. Der Patient 8 des Kollektiv II erhielt lediglich ein frisches gepooltes TK, da der vorgesehene Einzelspender nicht zur Zellseparation erschien; auf entsprechende Messungen wurde daher verzichtet. Bei 6 Patienten des Kollektiv III fiel der HLA-crossmatch negativ aus; lediglich bei Patient 4, der sich wie erwähnt in moribundem Zustand befand, war dieser Test nicht auswertbar (vergleiche Tabelle 15).

Patient-Nr.		2	3	4	5	6	7	9
Thrombozytenwerte des Patienten (mcl ⁻¹)	a	42000	70000	6000	50000	16000	32000	18000
	b	96000	116000	22000	84000	20000	50000	42000
RTG: P _R	a	4,47	4,00	-	4,63	12,33	7,46	8,81
	b	2,05	2,72	15,38	1,90	7,91	3,49	3,65
TEG: max _E	a	61	96	-	82	79	42	52
	b	89	108	90	109	87	47	57
Gerinnungs- retr. (%)	a	9	12	0	11	0	12	4
	b	17	17	0	14	0	16	11
60'	a	25	27	0	20	8	28	22
	b	35	36	3	30	10	36	33
120'	a	36	38	0	34	15	40	36
	b	51	52	5	46	18	45	49
180'	a	43	45	0	42	19	51	53
	b	62	59	7	55	21	56	64
Thrombozyten x 10 ¹¹ des transfundierten TK korrigiertes Increment ($\frac{m^2}{mcl} \times 10^{-8}$)		3,93	2,86	3,41	5,67	3,51	3,76	2,70
		23,08	29,59	8,49	12,35	2,17	7,71	18,31

Tab.16: In-vivo Testergebnisse bei 7 Patienten, die je 1 frisches TK erhielten, nachdem ihnen 3 Std. zuvor je 2 friergelagerte TKs verabreicht worden waren. a = vor Transfusion des frischen TK (= 3 Std. nach Transf. der friergelagerten TKs), b = 3 Std. nach Transf. des frischen TK. Zusatzdaten entsprechend den Tabellen 14 und 15.

4.3.4. Synopsis der in-vivo Testergebnisse der Kollektive I, II und III

In der Tabelle 17 sind die Mittelwerte der in-vivo Testergebnisse aus den Kollektiven I, II und III gegenübergestellt. Diese Werte ergeben sich durch die arithmetische Mittelung der in den Tabellen 14, 15 und 16 dargestellten Einzelmeßwerte.

Kollektiv-Nr.		I	II	III
n = Anzahl der transf. Pat.		12	9	7
Thrombozytenwerte der Pat. (mcl ⁻¹)	a	27 500	23 500	33 500
	b	50 000	35 000	61 500
RTG: P _R	a	11,11	9,70	6,95
	b	7,83	7,12	3,62
TEG: max _E	a	67	64	69
	b	93	67	84
Gerinnsel-retr. (%)	20'	a	4	6
		b	9	7
	60'	a	15	14
		b	26	19
	120'	a	24	24
		b	39	29
	180'	a	30	30
		b	45	35
Thrombozyten x 10 ¹¹ der transf. TKs		3,91	4,01	3,69
korrigiertes Increment ($\frac{m^2}{mcl} \times 10^{-8}$)		9,98	5,57	14,53

Tab.17: Synopsis der Mittelwerte der in-vivo Testergebnisse aus den Kollektiven I, II und III. Kollektiv I und III = Transfusion frischer TKs, Kollektiv II = Transfusion friergelagerter TKs. a = vor Transfusion, b = 3 Std. nach Transf.

Da in der Synopsis der Tabelle 17 die Vergleichbarkeit der Transfusionsergebnisse zwischen frischen und friergelagerten TKs dadurch erschwert ist, daß auch die Patienten mit in die Auswertung eingingen, bei denen das Vorliegen anti-thrombozytärer Antikörper wahrscheinlich war (positiver HLA-crossmatch), bleiben in der Tabelle 18 diese Patienten unberücksichtigt. Im einzelnen handelt es sich dabei um den Patienten 1 aus Kollektiv II/III und um die Patienten 1 und 5 aus Kollektiv I. Ebenso bleibt der Patient 4 aus Kollektiv II/III in der Tabelle 18 unberücksichtigt, da er sich in moribundem Zustand befand und ein Teil der Thrombozytentests (RTG, TEG) nicht auswertbar war. Zur Veranschaulichung der in der Tabelle 18 dargestellten Mittelwert-Differenzen (Spalte c) sind diese Werte in der Abbildung 7 nochmals in Form eines Säulendiagramms graphisch dargestellt. Abschließend werden in der Tabelle 19 die Mittelwert-Differenzen der einzelnen Meßparameter des Kollektiv II einerseits auf die des Kollektiv I und andererseits auf die des Kollektiv III prozentual bezogen.

Kollektiv-Nr.		I	II	III
n = Anzahl der transfundierten Patienten		10	7	6
Thrombozytenwerte der Patienten (mcl^{-1})	a	28 500	28 000	38 000
	b	56 500	43 500	68 000
Thrombozytenanstieg	c	28 000	15 500	30 000
RTG: P_R	a	11,59	8,12	6,95
	b	7,44	6,31	3,62
	c	4,15	1,81	3,33
TEG: $\max_E$	a	66	70	69
	b	87	74	83
	c	21	4	14
Gerinnungselre- 20'	a	4	7	8
traktion (%)	b	10	9	13
	c	6	2	5
60'	a	15	17	22
	b	28	23	30
	c	13	6	8
120'	a	24	28	33
	b	41	35	44
	c	17	7	11
180'	a	30	36	42
	b	47	44	53
	c	17	8	11
Thrombozyten $\times 10^{11}$ je transf. TK (Koll.II:je 2 TK)		3,89	3,71	3,74
korrigiertes Increment ($\frac{\text{m}}{\text{mcl}} \times 10^{-8}$)		11,98	7,05	15,54

Tab.18: Synopsis der Mittelwerte der in-vivo Testergebnisse aus den Kollektiven I, II und III unter Eliminierung der Patienten, bei denen das Vorliegen antithrombozytärer Antikörper wahrscheinlich war. a = vor Transfusion, b = 3 Std. nach Transfusion, c = b - a (Differenz vor und nach Transfusion)

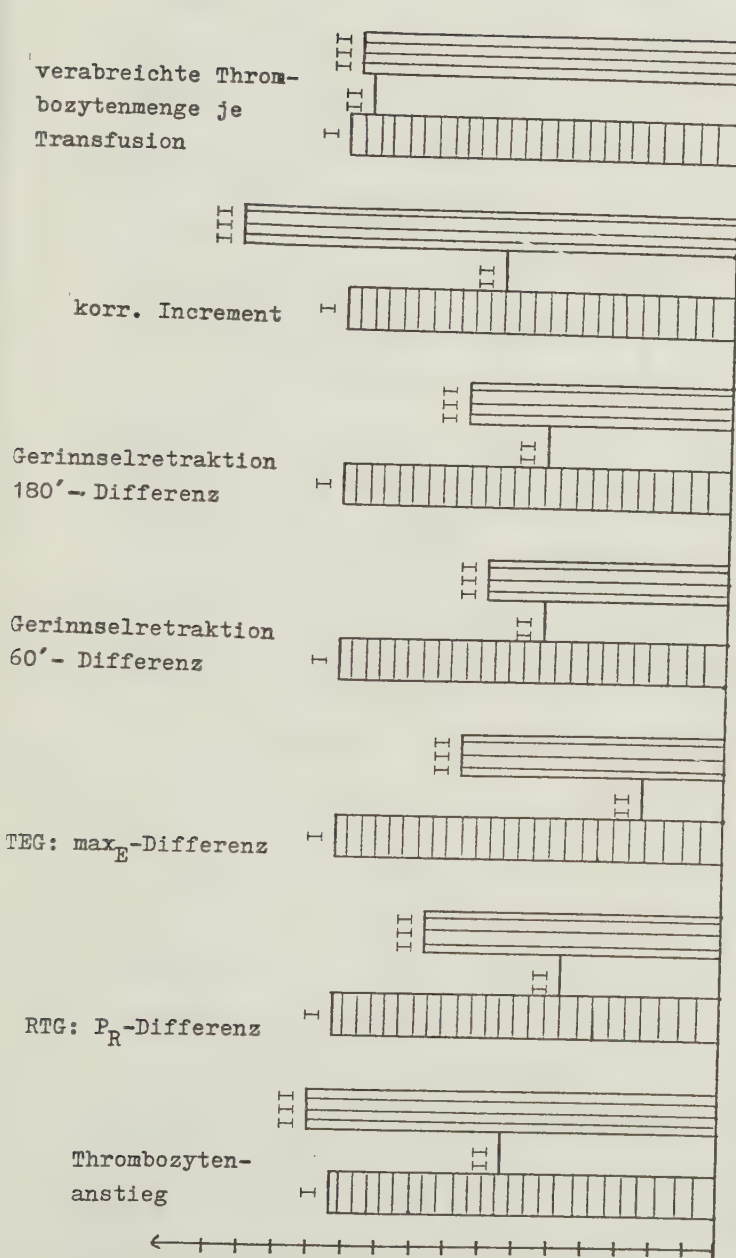


Abb.7: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Differenzwerte der einzelnen Meßparameter entsprechend den in den Spalten c der Tab.18 dargestellten Werten. Horizontal schraffierte Säulen = Kollektiv I (für alle Parameter gleich hoch gewählt), leere Säulen = Kollektiv II, vertikal schraffierte Säulen = Kollektiv III.

Kollektiv		II : I	II : III
Thrombozytenanstieg		55 %	52 %
RTG: P_R		44 %	54 %
RTG: $\max_E$		19 %	29 %
Gerinnungselre- traktion	20'	33 %	40 %
	60'	46 %	75 %
	120'	41 %	64 %
	180'	47 %	73 %
horr. Increment		59 %	45 %

Tab.19: Prozentuale Verbesserung der Mittelwert-Differenzen der einzelnen Meßparameter bei Transfusion friergelagerter TKs (= Kollektiv II, n = 7) im Vergleich zur Transfusion frischer TKs (= Kollektiv I, n = 10) und im Vergleich zur Transfusion frischer TKs bei Patienten, die 3 Std. zuvor friergelagerte TKs vom selben Spender erhielten (= Kollektiv III, n = 6).

5. Diskussion

5.1. In-vitro Untersuchungen an friergelagerten TKs unter Verwendung 9 verschiedener Frierlösungen

Nachdem eigene Voruntersuchungen zur Gefrierkonservierung von Thrombozytenkonzentraten unter Verwendung von 4% HÄS und 2% DMSO als Frierschutzmedium keinen nennenswerten Erfolg gebracht hatten, wurden in einer reinen in-vitro Studie 9 unterschiedliche Frierlösungen getestet. Aus der vergleichenden Zusammenstellung dieser Meßergebnisse (Tab.12, Seite 40) ist ersichtlich, daß das mit 6% DMSO und 1000 KIE Aprotinin/ml behandelte TK nach Auftauen und Waschen den mit anderen Frierlösungen behandelten TKs überlegen ist. Die Verwendung von DMSO in einer Endkonzentration von 6% erweist sich also für die Gefrierkonservierung von Thrombozytenkonzentraten als vorteilhaft, eine Erkenntnis, die auch durch neuere Untersuchungen von Kotelba-Witkowska und Schiffer (29) gestützt wird. Gerade diese Autoren sprachen sich 1982 ebenfalls für die Verwendung von DMSO aus, nachdem sie bei der Verwendung von Glycerol-Glukose als Frierschutzmittel deutlich schlechtere Ergebnisse erhalten hatten.

Die zusätzliche Verwendung von Aprotinin, dem in zahlreichen Untersuchungen von Harke und Mitarbeitern (11/12) ein die Thrombozytenmembran stabilisierender Effekt zugeschrieben wird, scheint auch auf friergelagerte Thrombozyten einen günstigen, wenn auch geringfügigen, Einfluß zu haben. Sichere Schlußfolgerungen über den Nutzen einer Aprotininzugabe bei der Gefrierkonservierung sind jedoch wegen der geringen Zahl an Untersuchungen noch nicht möglich.

5.2. In-vitro Untersuchungen an frischen und friergelagerten TKs unter Verwendung von 6% DMSO und Aprotinin

Bei der Untersuchung von insgesamt 37 frischen Thrombozytenkonzentraten sowie 18 Thrombozytenkonzentraten nach Frierlagerung mit 6% DMSO und Aprotinin stellt sich bei den friergelagerten TKs eine durchschnittliche in-vitro recovery von 51% heraus. Die Mittelwerte der übrigen Meßergebnisse wie RTG, TEG, Gerinnselretraktion, ADP-, Collagen- und Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation, die nach 3 Kollektiven geordnet ausgewertet wurden, streuen in engen Grenzen, so daß die Testmethoden an sich als zuverlässig angesehen werden dürfen. Die entsprechenden Meßergebnisse bei friergelagerten TKs zeigen nach Auftauen im Vergleich zu frischen TKs im einzelnen:

- a) nahezu eine Verdopplung des Plättchenindex (P_R) im RTG
- b) die maximale Thrombuselastizität ($\max'_E$) im TEG ist um etwa 33% reduziert
- c) die Gerinnselretraktion verschlechtert sich um ca. 25%
- d) in den Aggregationstests ergeben sich Einbußen von etwa 70 - 80%

Die Variabilität dieser Testergebnisse weist eindrücklich auf die Problematik zur Erfassung der Thrombozytenfunktion hin: Bei einem numerischen Thrombozytenverlust von 49% durch die Gefrierkonservierung verschlechtern sich TEG und Gerinnselretraktion lediglich um 33% bzw. 25%, wogegen die Thrombozytenaggregationstests mit einer Verschlechterung von 70% bis 80% verhältnismäßig schlecht ausfallen. Unter diesen Umständen muß daher versucht werden, aus der Zusammenschau der

einzelnen Meßparameter zu einer näherungsweisen Gesamtbeurteilung der Thrombozytenfunktion nach Gefrierkonservierung zu kommen. Insgesamt dürfte unter den Bedingungen der vorliegenden Untersuchung die Thrombozytenfunktion durch die Frierlagerung um etwa 50% reduziert sein. Bei Untersuchungen anderer Autoren liegt die in-vitro recovery friergelagerter Thrombozyten je nach Untersucher und angewandter Testmethode in der Größenordnung von 40 - 80%:

- a) Schiffer e.a., 1976 (39): freeze-thaw-wash-loss = 36%
- b) Kim und Baldini, 1974 (22): in-vitro recovery = 40 - 50%
- c) Melaragno e.a., 1982 (31): in-vitro recovery = 80%
- d) van Imhoff e.a., 1982 (21): funktionelle Schädigung friergelagerter Thrombozyten = mindestens 50%

Wegen der unterschiedlichen Methoden zur Gefrierkonservierung von TKs und der zahlreichen unterschiedlichen Testmethoden für Thrombozyten ist -wie schon im Abschnitt 1 erwähnt- die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Untersuchungen erheblich erschwert.

5.3. In-vivo Untersuchungen zur Transfusion frischer und friergelagerter TKs im Vergleich

12 Patienten erhielten jeweils 1 frisches TK, weitere 9 Patienten erhielten je 2 friergelagerte TKs und 7 dieser Patienten zusätzlich je 1 frisches TK vom selben Spender. Um eine vorbestehende Alloimmunisierung der transfundierten Patienten gegen Spenderantigene auszuschließen oder zu bestätigen wurde bei fast allen Patienten ein HLA-crossmatch durchgeführt und diejenigen Patienten, bei denen der Test positiv ausfiel,

aus der entgültigen Datenauswertung eliminiert.

In der Zusammenschau der Meßergebnisse der einzelnen Kollektive (Tabelle 18 und 19, Seite 52 und 54) fällt auf, daß das korrigierte Increment nach Transfusion friergelagerter TKs zwar mit 59% auf eine gute in-vivo recovery schließen läßt, daß aber andererseits die übrigen Tests, die mehr die Thrombozytenfunktion widerspiegeln lediglich in einer Größenordnung von etwa 40% liegen. Die maximale Thrombuselastizität im TEG erreicht sogar nur etwa 20% des Wertes, den man nach Transfusion frischer TKs erhält; das TEG sollte jedoch bei der Beurteilung der Thrombozytenfunktion eher am Rande mitbetrachtet werden, da hierin auch andere Funktionsparameter der Blutgerinnung wie Quantität und Qualität des Fibrinaufbaus eine Rolle spielen. Beim Vergleich der Meßergebnisse nach Transfusion friergelagerter TKs mit denen frischer TKs beim selben Patienten (Kollektiv III) ist hervorzuheben, daß einerseits die Funktionsparameter RTG und Gerinnselretraktion zwar in der Größenordnung von 40 - 75% liegen, daß aber andererseits das korrigierte Increment mit nur 45% hier vergleichsweise schlechter ausfällt. Die Ursache für diesen scheinbaren Widerspruch mag wohl darin liegen, daß die Patienten des Kollektiv III, die ja mit je 2 friergelagerten TKs vortransfundiert waren, vor der Transfusion der zusätzlich verabreichten frischen TKs höhere Thrombozytenausgangswerte hatten und dadurch der latente Verbrauch an Thrombozyten unwahrscheinlicher war als nach der Transfusion der friergelagerten TKs bei entsprechend niedrigeren Thrombozytenausgangswerten. Diese Erklärung wird auch dadurch gestützt, daß das korrigierte Increment bei Kollektiv I, obwohl es sich ja

ebenso wie bei Kollektiv III um die Transfusion frischer TKs mit äquivalenten Thrombozytenmengen handelte, deutlich niedriger ausfällt als bei Kollektiv III. Aus dem kritischen Vergleich zwischen den Kollektiven II und I zum einen und den Kollektiven II und III zum anderen kann daher der Schluß gezogen werden, daß für die Beurteilung der hämostatischen Effektivität friergelagerter Thrombozyten die Gegenüberstellung der Kollektive II : I aussagekräftiger ist als die Gegenüberstellung der Kollektive II : III.

In früheren Untersuchungen anderer Autoren variiert die in-vivo recovery nach Transfusion friergelagerter Thrombozyten etwa zwischen 45 und 80%:

- a) Schiffer e.a., 1976 (39): in-vivo-CIC (= in-vivo-corrected increment-count) = $7,1 \times 10^{-8} \frac{\text{m}^2}{\text{mcl}}$ bei autologen friergelagerten TKs
- b) Kim und Baldini, 1974 (22): in-vivo-CIC = $12 \times 10^{-8} \frac{\text{m}^2}{\text{mcl}}$ entsprechend 80% im Vergleich zu frischen TKs
- c) Melaragno e.a., 1982 (31): in-vivo recovery bei frischen TKs = 70%, in-vivo recovery bei friergelagerten TKs = 31%
- d) van Imhoff e.a., 1982 (21): CIC bei autologen friergelagerten TKs = 56% im Vergleich zu frischen TKs

Interessanterweise liegt bei den Untersuchern, die über eine höhere in-vitro recovery berichten, die in-vivo recovery meist deutlich niedriger vice versa (vergleiche Abschnitt 5.2., Seite 57). Diese Beobachtung macht deutlich, daß gute in-vitro recovery-Raten keineswegs die Gewähr dafür darstellen, daß daraus auch eine gute in-vivo recovery resultieren muß; andererseits schließen mäßige in-vitro recovery-Raten eine vernünfti-

ge in-vivo recovery nicht unbedingt aus. Weiterhin erscheint interessant, daß lediglich in der Untersuchung von Kim und Baldini 1974 (22) über die relativ hohe in-vivo-recovery von etwa 80% berichtet wird, während in anderen Arbeiten, vor allem auch in den neueren Arbeiten von Melaragno e.a. 1982 (31) und van Imhoff e.a. 1982 (21) über erheblich bescheidenere in-vivo recovery-Raten von 45 - 56% berichtet wird, und das, obwohl alle erwähnten Autoren DMSO in einer Endkonzentration von ca. 5% als Frierschutzmittel verwendeten.

In diesem Zusammenhang erscheinen die eigenen Untersuchungsergebnisse mit einer in-vitro recovery von etwa 50% sowie einem korrigierten Increment von 59% und einer funktionellen in-vivo Wirksamkeit von etwa 40 - 75% in Abhängigkeit von der angewandten Testmethode den veröffentlichten Untersuchungsergebnissen anderer Autoren zumindest ebenbürtig. Die Frage nach dem derzeit besten Frierschutzmedium kann nach unseren Ergebnissen klar zugunsten von DMSO beantwortet werden, wogegen die Frage, ob Aprotinin einen zusätzlichen günstigen Einfluß bei der Gefrierkonservierung von Thrombozyten ausübt, noch nicht hinreichend beantwortet werden kann.

Für den routinemäßigen klinischen Einsatz kann die Gefrierkonservierung von TKs noch nicht allgemein empfohlen werden, da der organisatorische und finanzielle Aufwand bei einer im Vergleich zu frischen TKs deutlich geringeren Effektivität groß ist. Wohl aber erscheint bei ausgewählten Patienten die Verabreichung friergelagerter TKs in der hier beschriebenen Form sinnvoll und vertretbar:

- a) für Patienten bei geplanter Knochenmarkstransplantation, bei denen in der Phase der kompletten Remission autologe

Thrombozyten gesammelt und friergelagert werden können

- b) für Patienten, bei denen eine längerfristige Substitutions-
therapie mit Thrombozyten abzusehen ist, können zur Ver-
meidung einer frühzeitigen Alloimmunisierung TKs von ge-
eigneten HLA-typisierten Einzelspendern auf Vorrat einge-
froren werden
- c) Patienten mit multiplen Antikörpern können mit friergela-
gerten Thrombozyten von im HLA-System homozygoten Spen-
dern substituiert werden
- d) bei Versorgungsengpässen mit frischen TKs ist allemal die
ersatzweise Transfusion gefrierkonservierter Thrombozyten
vertretbar

Um kurzfristige Versorgungslücken von 2 bis 3 Tagen auszuglei-
chen, ist jedoch nach wie vor die Verwendung von TKs vorzu-
ziehen, die bei Raumtemperatur oder 4°C nach geeigneten Me-
thoden für maximal 72 Stunden gelagert wurden.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, anhand von in-vitro und in-vivo Untersuchungen an frischen und friergelagerten Thrombozytenkonzentraten zu einer vergleichenden Beurteilung der hämostatischen Wirksamkeit zu gelangen. Vorab sollte die Frage nach dem derzeit besten Frierschutzmedium durch reine in-vitro Tests geklärt werden.

Dazu wurden 9 Thrombozytenkonzentrate, die unmittelbar nach Zellseparation getestet worden waren, mit unterschiedlichen Frierlösungen eingefroren und nach einer Lagerdauer von etwa 8 bis 14 Tagen wieder aufgetaut, je nach Frierschutzmedium gewaschen und wiederum getestet. Weiterhin wurden 37 Thrombozytenkonzentrate in frischem Zustand sowie 18 TKs nach Gefrierkonservierung mit DMSO und Aprotinin nach einer durchschnittlichen Lagerdauer von 36 Tagen untersucht. Die in-vitro Tests vor Einfrieren und nach Auftauen umfaßten Thrombozytenzählung, TEG und RTG, Gerinnselretraktions- und Aggregationsmessungen. Schließlich wurden 19 Patienten je 1 frisches TK und 9 vergleichbaren Patienten je 2 friergelagerte TKs verabreicht. Unmittelbar vor und 3 Stunden nach Ende der Transfusion wurden Thrombozytenzählung, RTG, TEG und Gerinnselretraktionsmessungen durchgeführt.

Von den 9 mit verschiedenen Frierlösungen getesteten TKs zeigten die mit DMSO behandelten TKs die beste in-vitro recovery und die geringste funktionelle Schädigung der Thrombozyten. Ob Aprotinin tatsächlich einen günstigen Einfluß auf die Ge-

frierkonservierung von Thrombozyten ausübt, kann wegen der geringen Unterschiede der Meßergebnisse und der geringen Zahl an Untersuchungen nicht sicher entschieden werden. Die 18 zur Transfusion bestimmten friergelagerten TKs, die mit DMSO und Aprotinin eingefroren worden waren, wiesen eine durchschnittliche in-vitro recovery von 51% auf, die funktionelle Schädigung der Thrombozyten lag dabei etwa in der Größenordnung von 50%. Die in-vivo recovery der friergelagerten TKs lag im Vergleich zu frischen TKs im Mittel bei 59%, wogegen die funktionelle Wirksamkeit im Bereich von ca. 40 bis 70% in Abhängigkeit von der angewandten Testmethode lag.

Obwohl im Rahmen der vorliegenden Untersuchung DMSO als derzeit bestes Frierschutzmedium bestätigt werden kann und sich Hinweise dafür ergaben, daß Aprotinin einen weiteren, günstigen Einfluß bei der Gefrierkonservierung von Thrombozytenkonzentraten ausüben dürfte, kann die Frierlagerung von Thrombozyten noch nicht allgemein für die routinemäßige klinische Anwendung empfohlen werden. Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um insbesondere den Nutzen von Aprotinin (wirksamste Konzentration im Friergut, bester Zeitpunkt der Zugabe) und die optimalen Einfrier- und Auftaubedingungen von TKs abzuklären.

7.Literaturverzeichnis

- 1 Baldini, M.G., Costea, N., and Damashek, W.:
Blood 16, 1669 (1960).
- 2 Binsack, Th., Schal, T., Hiller, E., Riess, H., Mempel, W.:
Resonance-Thrombography: A new method for evaluation of the effectiveness of platelet transfusions. In: Blut 45, S.58, 1982.
- 3 Blauhut, B.:
Bedeutung und Möglichkeiten der Thrombozyten- und Granulozytentransfusion. Sonderdruck aus Biotest-Mitteilungen, Heft 37, 1979.
- 4 Breddin, K.:
Die Thrombozytenfunktion bei hämorrhagischen Diathesen, Thrombosen und Gefäßkrankheiten. Schattauer, Stuttgart 1968.
- 5 Breddin, K., Grun, H., Krzywanek, H.J., und Schremmer, W.P.:
Zur Messung der "spontanen" Thrombozytenaggregation. Plättchenaggregationstest III.Methodik. Klin.Wschr.53, S. 81 - 89, 1975.
- 6 Cohen, P., Gardner, F.:
"Blood Platelets", p.485, Little, Brown and Co., Boston 1961.
- 7 Cohen, P., Gardner, F.:
Platelet preservation. II.Preservation of canine platelet concentrates by freezing in solutions of glycerol plasma. In: J.clin.Invest. 41: 10 - 19, 1962.
- 8 Dayian, G., Pert, J.H.:
A simplified method for freezing human blood platelets in glycerol-glucose using a statically controlled cooling rate device. Transfusion 1979: 19: 255 - 260.

- 9 Fratanioni, J.C. and Poindexter, B.J.:
Dimethyl sulfoxide: effects on function of fresh platelets
and on the viability of platelets in storage. Transfusion
1983; 23: 109 - 113.
- 10 Handin, R.J., and Valeri, C.R.:
Improved viability of previously frozen platelets.
Blood 40, 509 - 513, 1972.
- 11 Harke, H.:
Hemmung der Aggregatbildung in Aprotinin-ACD-Blutkonserven.
In: Matthes, M., Nagel, V. (Hrsg): Forschungsergebnisse
der Transfusionsmedizin und Immunhämatologie 5. Medicus,
Berlin 1978, S. 551 - 555.
- 12 Harke, H., Gennrich, M.:
Aprotinin-ACD-Blut. Experimentelle Untersuchungen über den
Einfluß von Aprotinin auf die plasmatische und thrombozytäre
Gerinnung. In: Anaesthesist 29, S. 266 - 276, 1980.
- 13 Hartert, H.:
Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem
neuen Untersuchungsverfahren. Klin. Wschr. 26, S. 577, 1948.
- 14 Hartert, H.:
Die Thrombelastographie. Eine Methode zur physikalischen
Analyse des Blutgerinnungsvorganges. Z. exper. Med. 117,
S. 189, 1951.
- 15 Hartert, H.:
The proper phase of coagulation. Its physical differentiation
by Resonance-Thrombographie and Thrombelastographie.
Clin. Hemorheology, 2, 1/2, pp. 51 - 70, 1982.
- 16 Hartert, H.:
Rheosimulation: A new method for the assay of clotting
process and factor VIII. A preliminary report. 1st Inter-
nat. Congr. of Biorheology 11, 355, 1974.

- 17 Hartert, H.:
Resonanzthrombographie, die Untersuchungsmethode der eigentlichen Blutgerinnungsphase. Verhandlungsbericht d. 25.Tagg. Dtsch.Arb. Gemeinschaft f. Blutgerinnung, München, Feb. 1981, Schattauer, Stuttgart - New York, S. 477.
- 18 Hartert, H.:
Resonance-Thrombographie, theoretical and practical elements. Biorheology 18, 639 - 701, 1981.
- 19 Hiemeyer, V., Rasche, H., Diehl, K.:
Hämorrhagische Diathesen. Grundlagen-Diagnostik-Therapie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1972.
- 20 Hiller, E.:
Atlas der Resonanzthrombographie. Verlag Hygieneplan GmbH, Oberursel, 1982.
- 21 Imhoff van, G.W., Arnaud, F., Postmus, P.E., Mulder, N.H., Das, P.C., Smit Sibinga, C.Th.:
Autologous cryopreserved Platelets and Prophylaxis of bleeding in Autologous Bone Marrow Transplantation. Address for reprints: Imhoff van, G.W.: Division of Haematology, Department of Medicine, University Hospital, 9713 EZ Groningen, The Netherlands, 1982
- 22 Kim, B.K., and Baldini, M.G.:
Biochemistry, function and hemostatic effectiveness of frozen human platelets. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 145, 850 - 855, 1974.
- 23 Kim, B.K., Tanoue, U., Baldini, M.G.:
Storage of Human Platelets by Freezing. Vox Sang. 43: 321 . 326, 1982.
- 24 Kim, B.K. and Baldini, M.G.:
Preservation of Viable Platelets by Freezing. Effect of Plastic Containers. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 142: 345 - 350, 1973.

- 25 Kim, B.K. and Baldini, M.G.:
Glycolytic Intermediates and Adenine Nucleotides of Human Platelets. II. Effect of Short-term Storage at +4°C.
Transfusion: Vol. 12 Nr.1, Jan-Feb. 1972.
- 26 Kim, B.K., and Baldini, M.G.:
Cryobiology 9, 329, 1972.
- 27 Kim, B.K., and Baldini, M.G.:
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 142, 345, 1973.
- 28 Knott, L.J.:
Safety of intravenous Dimethylsulphoxide.
The Lancet, Dec.13, 1980, S. 1299.
- 29 Kotelba-Witkowska, B. and Schiffer C.A.:
Cryopreservation of platelet concentrates using glycerol-glucose. Transfusion: 22, 121 - 124, 1982.
- 30 Lazarus, H.M., Herzig, R.H., Warm, S.E. and Fishman, D.J.:
Transfusion experience with platelet concentrates stored for 24 to 72 hours at +22°C. Importance of storage time.
Transfusion 22: 39 - 43, 1982.
- 31 Melaragno, A.J., Abdu, W.A., Katchis, R.J., Vecchione, J.J., Valeri, C.R.:
Cryopreservation of platelets isolated with the IBM 2997 blood cell separator: A rapid and simplified approach.
Vox sang. 43: 321 - 326, 1982.
- 32 Mempel, W., Heim, M., Kettler, H., Horst, S., Eckstein, R., Mempel, M., Hiller, E.:
Clinical effectiveness of cryopreserved platelets collected with the Fenwal CS-3000 blood cell separator. Abstracts International Society of Haematology European and African Division, S.168, 1983.

- 33 Mempel W., Heim, M., Eckstein, R., Schleuning, M., Horst, S., Kettler, H.:
Gefrierkonservierung in einem modernen Bluttransfusionszentrum. In: Fortschr.Med. 101 Jg., Nr. 44, 1983.
- 34 Mempel, W., Heim, M., Kettler, H., Binsack, Th., Mempel, M., Horst, S.:
Comparison of clinical effectiveness of fresh and cryopreserved platelets collected with the Fenwal CS-3000 blood cell separator. The second European meeting of Fenwal Haemapheresis Club, Brussels - May 18 - 20, 1983.
- 35 Mueller-Eckhardt, Chr.:
Histokompatibilität und Thrombozytentransfusion. In: Blut, Band 34, S.261 - 270, 1977.
- 36 New from Fenwal Laboratories, Division of Travenol Lab., INC. CS-3000TM Blood Cell Separator for fully automatic, high yield harvesting of blood components. Copyright 1980 Travenol Laboratories, INC.
- 37 Sarstedt, 5223 Nürnberg-Rommelsdorf. Thrombo Plus, Solo-test für die direkte Zählung der Thrombozyten mit verschiedenen Verdünnungen. Gebrauchsanweisung.
- 38 Savage, B.:
Platelet adenine nucleotide levels during room-temperature storage of platelet concentrates. Transfusion 22: 288 - 291, 1982.
- 39 Schiffer, C.A., Büchholz, D.H., Aisner, J., Wolff, J.H., and Wiernik, P.H.:
Frozen Autologous Platelets in the Supportive Care of Patients with Leukemia. Transfusion, Vol.16, Nr.4, 321 - 329, 1976.
- 40 Trounson, A. und Mohr, L.:
Extrakorporale Befruchtung. Schwangerschaften mit gefrorenen Embryonen. In: Ärztezeitung Nr. 205, 1983. Nach einem Beitrag in: Nature 305, 1983.

- 41 Vecchione, J., Chomicz, S., Emerson, C., Valeri, C.:
Cryopreservation of human platelets isolated by discontinuous-flow centrifugation using the Haemonetics Model 30 Blood Processor. Transfusion 20: 393 - 400, 1980.
- 42 Yellowless, P., Greenfield, C., McIntyre, N.:
Dimethylsulphoxide - induced Toxicity. The Lancet, Nov.8, 1980, S.1004 - 1006.

8. Lebenslauf

Ich wurde am 6.5.1955 als erster Sohn des Schäfermeisters Georg Kettler und seiner Ehefrau Margarete Kettler, geb. Steinmetz, in Herbrechtingen an der Brenz geboren.

- 1961 - 1965 Besuch der Volksschule in Gundelfingen/Do.
1966 - 1975 Besuch des Albertus-Gymnasiums in Lauingen/Do.
Juni 1975 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
1976 - 1977 Ableistung des Grundwehrdienstes
1977 - 1984 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians
Universität in München
März 1979 Ärztliche Vorprüfung
März 1980 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1982 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab März 1982 Klin.-experimentelle Doktorarbeit im Trans-
fusionszentrum der Med. Klinik III Großhadern
ab April 1983 Praktisches Jahr im Rahmen der AO:
- Klinikum Großhadern : Innere Medizin
- KZV Augsburg : Chirurgie
- Klinikum Großhadern : Radiologie
April/Mai 1984 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab Juni 1984 Assistenzarzt in der Inneren Abt. des Kreis-
krankenhauses Lauingen/Do.
Berufsziel: Weiterbildung zum Arzt für Innere Medizin

